

**MODULATION DES LEBERWACHSTUMS NACH PFORTADERLIGATUR
MITTELS HEPATOTROPER WACHSTUMSFAKTOREN**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Annika Marissa Böhm
geboren am 20.06.1988 in Düsseldorf

Gutachter

1. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena
2. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Jena
3. PD Dr. Andreas Schnitzbauer, Frankfurt/Main

Datum der Verteidigung: 04.03.2014

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BrdU	Bromodesoxyuridin
CHOL	Pfortaderligatur mit Cholestase-Gruppe
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNM	Dimethylnitrosamine
EGF	Epidermal growth factor
EPO	Erythropoetin
FGF	Fibroblast growth factor
FRLV	Future remnant liver volume
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HGF	Hepatocyte growth factor
HVJ	Hemagglutinating virus of Japan
IL-6	Interleukin-6
PH	Partielle Hepatektomie
PVE	Portal vein embolisation, Pfortaderembolisation
PVL	Portal vein ligation, Pfortaderligatur
rhHGF	Recombinant human hepatocyte growth factor
ROI	Regions of interest
SHAM	Kontroll-Gruppe
Tab.	Tabelle
TELV	Total estimated liver volume
TGF- α	Transforming growth factor-alpha
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyl transferase mediated dUTP biotin Nick End Labeling

2 Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	3
2	Inhaltsverzeichnis	4
3	Zusammenfassung.....	6
4	Einleitung	8
4.1	Leberregeneration im Allgemeinen.....	8
4.2	Leberregeneration nach Resektion	9
4.3	Bedeutung der Wachstumsfaktoren	10
4.4	Leberresektion nach Pfortaderembolisation.....	11
5	Ziele der Arbeit.....	12
6	Methodik	13
6.1	Studienpopulation.....	13
6.2	Ablauf der Studie	14
6.3	Untersuchungsmethoden	20
6.3.1	Gewichte	20
6.3.2	Laborwerte.....	20
6.3.3	Histologische Untersuchung	21
6.4	Statistik.....	23
7	Ergebnisse.....	25
7.1	Pfortaderligatur und Kontrolle.....	25
7.1.1	Gewichte	25
7.1.2	Laborwerte.....	26
7.1.3	Histologie	29
7.2	Pfortaderligatur mit und ohne Cholestase	33
7.2.1	Gewichte	33
7.2.2	Laborwerte.....	35
7.2.3	Histologie	39

7.3	Pfortaderligatur mit und ohne Wachstumsfaktoren	41
7.3.1	Gewichte	41
7.3.2	Laborwerte.....	44
7.3.3	Histologie	48
8	Diskussion	53
8.1	Methodendiskussion	53
8.2	Pfortaderligatur und Kontrolle.....	53
8.2.1	Gewicht	54
8.2.2	Laborwerte.....	56
8.2.3	Histologie	56
8.3	Pfortaderligatur mit und ohne Cholestase	57
8.3.1	Gewicht	57
8.3.2	Laborwerte.....	59
8.3.3	Histologie	61
8.4	Pfortaderligatur mit und ohne Wachstumsfaktoren	62
8.4.1	Epidermal growth factor.....	63
8.4.2	Erythropoetin	64
8.4.3	Hepatocyte growth factor	65
9	Schlussfolgerung	69
10	Literaturverzeichnis	71
11	Anhang.....	81

3 Zusammenfassung

Die Pfortaderembolisation am Menschen ist eine etablierte therapeutische Maßnahme um bei Patienten mit zentralen Lebertumoren und der Notwendigkeit einer erweiterten Leberresektion das Risiko eines postoperativen Leberversagens zu verringern. Sie induziert in der nicht-embolisierten Leber einen Zuwachs an funktionstüchtigem, gesundem Gewebe. Allerdings kommt es bei einigen Patienten nur zu einer geringen postinterventionellen Zunahme des Lebertumens bzw. muss einigen Patienten ein langes Zeitintervall zwischen Embolisation und Operation einkalkuliert werden.

Das Ziel dieser Studie war, den Effekt verschiedener stimulierender Faktoren auf die Leberhypertrophie nach einer Pfortaderligatur zu überprüfen.

In unserer tierexperimentellen Studie an 71 männlichen Wistar-Ratten wurde überprüft, ob die hepatotropen Wachstumsfaktoren Epidermal growth factor (EGF), Hepatocyte growth factor (HGF) und Erythropoetin (EPO) die Leberregeneration nach einer Pfortaderligatur zusätzlich stimulieren. Dazu wurden die Tiere in sechs Gruppen eingeteilt: 1. Kontrollgruppe, 2. alleinige Pfortaderligatur (PVL= englisch „portal vein ligation“), 3. PVL und Ligatur des Hauptgallenganges, 4. PVL mit EGF, 5. PVL mit HGF und 6. PVL mit EPO. Nach einer Beobachtungszeit von 24 Stunden (n=36) und von 120 Stunden (n=35) wurden die Tiere getötet und die Leber entnommen.

Das Gesamtlebergewicht sowie die Gewichte der ligierten und nicht-ligierten Lappen der Leber wurden bestimmt. Nach immunhistologischer Färbung der formalinfixierten Leber mit einem Proliferationsmarker (ki-67) und einem Apoptosemarker (TUNEL) wurde der Proliferations- bzw. Apoptoseindex berechnet. Die Blutproben wurden präoperativ, postoperativ sowie nach 120 Stunden entnommen und GLDH, ALAT, alkalische Phosphatase, direktes und gesamtes Bilirubin, Kreatinin, Gesamteiweiß und Harnstoff bestimmt.

Zwischen der Kontroll- und der PVL-Gruppe zeigten sich eine signifikante Gewichtszunahme des nicht-ligierten Leberabschnittes sowie eine stark erhöhte Proliferation als Zeichen der Hypertrophie. Dieser Effekt war bei Leberschädigung durch Cholestase nicht verringert. Die zusätzliche portale Gabe von EGF

oder EPO nach der Pfortaderligatur beeinflussten nicht die Gewichtszunahme oder Proliferation. Alleine HGF zeigte eine stimulierende Tendenz.

Insgesamt konnte der Hypertrophie/Atrophie-Effekt auf die Leber nach experimenteller Pfortaderligatur im Rattenmodell bestätigt werden. Die zusätzliche portale Injektion von HGF nach der Pfortaderligatur könnten das Wachstum des nicht-ligierten Leberabschnittes fördern.

4 Einleitung

Die Inzidenz von Lebertumoren im Jahr 2012 betrug nach Angaben des Robert Koch-Instituts 7.500 Menschen pro Jahr in Deutschland. Zu den häufigsten Lebertumoren gehören das hepatozelluläre Karzinom, sowie das cholangiozelluläre Karzinom und sind die zehnt häufigste Krebstodesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut 2012). Zentrale Lebertumore können mit erweiterten Leberresektionen kurativ therapiert werden. Da nach den ausgedehnten Operationen häufig nur ein geringer Leberanteil in situ bleibt, ist das Risiko für ein postoperatives Leberversagen erhöht (Rahbari et al. 2011). Um diesen Leberanteil zu vergrößern, wird in hepatobiliären Zentren häufig eine Pfortaderembolisation der kranken Seite durchgeführt, die dann zu einer präoperativen Vergrößerung der gesunden Seite führt. Aber auch mit diesem Verfahren allein ist nicht immer eine ausreichende Vergrößerung zu erreichen, so dass in dieser Studie der Einfluss einer zusätzlichen Gabe von verschiedenen hepatotropen Wachstumsfaktoren untersucht wurde.

4.1 Leberregeneration im Allgemeinen

Die Leber ist ein lebenswichtiges Organ, indem sie vitale Funktionen erfüllt wie die Metabolisierung von Kohlenhydraten, Fetten und Vitaminen, die Elimination von schädlichen Stoffwechselprodukten, sowie die Synthese von Proteinen wie Albumin, Akute-Phase-Proteine, Lipoproteine, Enzyme und Cofaktoren. Schwere Verletzungen der Leber, ausgedehnte Resektionen, entzündliche oder maligne Lebererkrankungen sowie Intoxikationen, die diese Funktion massiv beeinträchtigen, gefährden den gesamten Organismus (Schmidt et al. 2005).

Wenn eine partielle Entfernung der Leber beabsichtigt wird, muss für eine ausreichende postoperative hepatische Funktion gesichert sein, dass mindestens 15-20 Prozent des Ausgangsvolumens erhalten bleibt. Diese restliche Leber reicht mit ihrer zunächst beschränkten Funktion zum Überleben aus. Aufgrund der zunehmenden Hypertrophie bzw. hervorragenden Regenerationsvermögen

der Leber verbessert sich die hepatische Funktion mit jedem postoperativen Tag. Innerhalb von Monaten verbessert sich die Leberfunktion deutlich, weil die Leber wieder auf die normale Größe hypertrophiert. Bereits 1931 beschrieben Higgins und Anderson (Higgins und Anderson 1931) diese außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit, die sehr komplexen Regulationsmechanismen unterliegt und noch nicht bis ins Detail geklärt ist.

4.2 Leberregeneration nach Resektion

Die Leberregeneration nach einer partiellen Leberresektion ist ein komplexer Wirkmechanismus, der üblicherweise in drei Phasen eingeteilt wird: Die erste Phase über Cytokine, die zweite über Wachstumsfaktoren und die dritte über Metabolismus (Yokoyama et al. 2007).

Die Cytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die in den Kupffer-Zellen produziert werden oder wie Interleukin-6, das in allen Leberzellen gebildet wird, induzieren bei den inaktiven Hepatozyten einen Wechsel in den Zellzyklus (G0/G1). Diese Vorbereitung der Hepatozyten wird Priming genannt und umfasst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1, STAT3 und C/EBP β) sowie der Genexpression von c-jun, c-fos und c-myc (Rauchfuss et al. 2012, Yokoyama et al. 2007).

Danach wirken Wachstumsfaktoren wie HGF (Hepatocyte growth factor) oder EGF (Epidermal growth factor), die die Zellen im Zellzyklus (G1/S) halten. Dieser Effekt wird durch TNF- α , Östrogene, Norepinephrine, Prostaglandine und Insulin weiter gesteigert, ohne dass sie selbst eine mitogene Funktion ausüben (Yokoyama et al. 2007).

Nach Durchlaufen der G2-Phase und der weiteren Initialisierung der Mitose der Hepatozyten beginnen die Proliferation der Leberstammzellen, Kupfferzellen, Gallenepithelzellen und der Endothelzellen sowie die Angiogeneese. Die Regeneration startet in der Peripherie der Leberlappen und folgt der physiologischen Migration der Zellen zum Zentrum. Neben den stimulierenden Faktoren

sind auch inhibierende bekannt wie TGF- β 1, Activin (Matsumoto et al. 1992) und die Akute-Phase-Proteine (Kusashio et al. 2009).

4.3 Bedeutung der Wachstumsfaktoren

Unter den Wachstumsfaktoren scheinen EGF und HGF am wichtigsten zu sein. EGF ist ein Protein, das bei der Einleitung der Mitose G1-S als Signalmolekül auftritt (Natarajan et al. 2007). Es wirkt auch als endokriner Faktor und wird in der Speicheldrüse gebildet (Fausto et al. 2006, Michalopoulos 2007). EGF-Rezeptoren befinden sich auf den Oberflächen der Hepatozyten. Sie werden nicht nur durch EGF, sondern auch durch TGF- α , Amphiregulin, Heparin-bindendes EGF, Betacellulin und Epiregulin aktiviert. Nach der Stimulation des EGF-Rezeptors wird über eine intrinsische Tyrosinkinase eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, die die Zellproliferation steigert. Die wichtigste Funktion des Rezeptors auf den Hepatozyten ist, die Stimulation der Proliferation zu gewährleisten und nicht das Überleben der Zellen (Natarajan et al. 2007).

HGF ist ein multipotenter Wachstumsfaktor mit mitogenen, morphogenen, motogenen, angiogenen, antiapoptotischen (Matsumoto und Nakamura 1992) und antifibrogenen (Matsuda et al. 1995, Yasuda et al. 1996) Eigenschaften. HGF wird in den Nicht-Parenchymzellen und besonders in den Leberstammzellen gebildet. Der c-Met-Protooncogen-Rezeptor vom HGF (Bottaro et al. 1991, Naldini et al. 1991) befindet sich auf der Oberfläche der Hepatozyten. HGF beeinflusst nicht nur spezifisch die Leberzellen, sondern viele verschiedene Zelltypen (Matsumoto und Nakamura 1992). HGF ist der stärkste Stimulator der DNA-Synthese in den Hepatozyten (Matsumoto und Nakamura 1992, Rubin et al. 1993). Nach partieller Leberresektion ist HGF bis 20-fach erhöht und führt als stärkster hepatotroper Wachstumsfaktor zur Leberregeneration (Fujiwara et al. 1993).

Erythropoetin (EPO) ist ein monomeres Glykoprotein, das in erster Linie in den peritubulären, interstitiellen Zellen der Niere (Fisher et al. 1996, Jacobson et al.

1957, Koury et al. 1991, Kuratowska et al. 1961) und zu einem geringeren Teil in den Hepatozyten (Koury et al. 1991, Zanjani et al. 1977) gebildet wird. EPO übt auf die Leber eine antiapoptotische sowie zytoprotektive Wirkung aus und kann die Entzündungsreaktion reduzieren (Le Minh et al. 2007).

4.4 Leberresektion nach Pfortaderembolisation

Bei zentralen Lebertumoren ist eine erweiterte Resektion erforderlich, welche mit einer hohen perioperativen Morbiditätsrate von 68 Prozent und einer Mortalitätsrate von 10 Prozent einhergehen (van Gulik et al. 2011). Ein zu großer Leberparenchymverlust kann vom Menschen nicht kompensiert werden. Ein Ausweg ist präoperative Konditionierung mittels Pfortaderembolisation (PVE), welche durch die Steigerung des funktionellen Leberrestvolumens zu einer Verringerung des postoperativen Risikos einer Leberdysfunktion führt. Soll also die rechte Leber entfernt werden und ist der linke Rest sehr klein, dann wird operativ oder interventionell die rechte Pfortader verschlossen. Die hämodynamischen Veränderungen führen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die eine Hypertrophie des nicht-ligierten Leberanteils bewirkt (Uemura et al. 2000). Durch diese Pfortaderligatur schrumpft die rechte Seite und die linke Seite vergrößert sich gleichzeitig. Die Hypertrophie der linken Seite erhöht dann eine ausreichende postoperative Leberfunktion, wenn dann die rechte Seite entfernt wurde.

Als orientierende Größe gilt heute, dass man eine ausreichende hepatische Funktion bei einem Leberrestvolumen von mindestens 20 Prozent unterstellt, wobei diese Angaben aber nur für eine gesunde Leber gelten. Nach einer Chemoembolisation benötigt man 30 Prozent und bei einer Leber mit einer verringerten Leberfunktion reichen wahrscheinlich erst 40 Prozent aus (Abdalla et al. 2001).

Um die Hypertrophie des „gesunden“ Leberlappens nach einem Pfortaderverschluss zu maximieren, wird nach Möglichkeiten gesucht, die konsekutive Hypertrophie der Leber zu erhöhen und zu beschleunigen.

5 Ziele der Arbeit

Eine Modulation des Leberwachstums wäre wünschenswert, da es zu einer unbefriedigenden Hypertrophie nach PVE kommen kann. In der vorliegenden Studie wurde ein tierexperimenteller Ansatz unter Verwendung von hepatotroper Wachstumsfaktoren gewählt. Als Methode wurde die Pfortaderligatur gewählt. Zusätzlich wurde bei einer Gruppe eine Cholestase durch die Ligatur des Hauptgallengangs als Negativkontrolle provoziert. Das Ziel dieser Studie war, den Effekt verschiedener stimulierender Faktoren auf die Leberhypertrophie nach einer Pfortaderligatur zu überprüfen. Es wurde unterstellt, dass die Hypertrophie des nicht-embolisierten Leberlappens durch Substanzen mit einem proliferativen Effekt beschleunigt werden könnte. Diese Vermutung wurde überprüft, indem direkt nach der experimentellen Pfortaderligatur Epidermal growth factor (EGF), Hepatocyte growth factor (HGF) oder Erythropoetin (EPO) in die Pfortader appliziert wurden. Sollten diese proliferativen Substanzen die Hypertrophie beschleunigen oder positiv beeinflussen, dann könnte ihr Effekt in Folgeexperimenten mit Tumoren gerechtfertigt sein.

6 Methodik

6.1 Studienpopulation

In dieser Studie wurde ein prospektives Rattenmodell nach Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz ausgewählt. Insgesamt wurden 71 männliche Wistar-Ratten eingeschlossen. Das Gesamtgewicht der Tiere schwankte zwischen 300 bis 580 g.

Die Ratten wurden in sechs Hauptgruppen eingeteilt:

Gruppe 1 Sham-Gruppe (n=12).

In dieser Kontrollgruppe wurde nur eine Laparotomie mit nachfolgender Mobilisation der Leber durch die Durchtrennung des Ligamentum falciforme vorgenommen.

Gruppe 2 PVL-Gruppe (n=12).

In dieser Gruppe wurde nach Laparotomie eine Ligatur der Pfortader vorgenommen.

Gruppe 3 Cholestase-Gruppe (n=12).

In dieser Gruppe wurde nach Laparotomie eine Ligatur der Pfortader und eine Ligatur des Hauptgallenganges vorgenommen.

Gruppe 4 EGF-Gruppe (n=11).

In dieser Gruppe wurde nach Laparotomie eine Ligatur der Pfortader vorgenommen und zusätzlich EGF appliziert.

Gruppe 5 HGF-Gruppe (n=12).

In dieser Gruppe wurde nach Laparotomie eine Ligatur der Pfortader vorgenommen und zusätzlich HGF appliziert.

Gruppe 6 EPO-Gruppe (n=12).

In dieser Gruppe wurde nach Laparotomie eine Ligatur der Pfortader vorgenommen und zusätzlich EPO appliziert.

Diese Hauptgruppen wurden in Abhängigkeit von der Nachbeobachtungszeit in zwei weitere Untergruppen eingeteilt. Die Nachbeobachtungszeit betrug entweder 24 Stunden oder 120 Stunden. Danach wurden die Tiere relaparotomiert.

Ein Tier ist während der Intervention im Experiment verstorben, so dass nur 5 Tiere in die EGF Gruppe nach 120 Stunden eingeschlossen werden konnten.

Tab. 1: Verteilung der 71 Ratten in die sechs Gruppen in Abhängigkeit von der Nachbeobachtungszeit

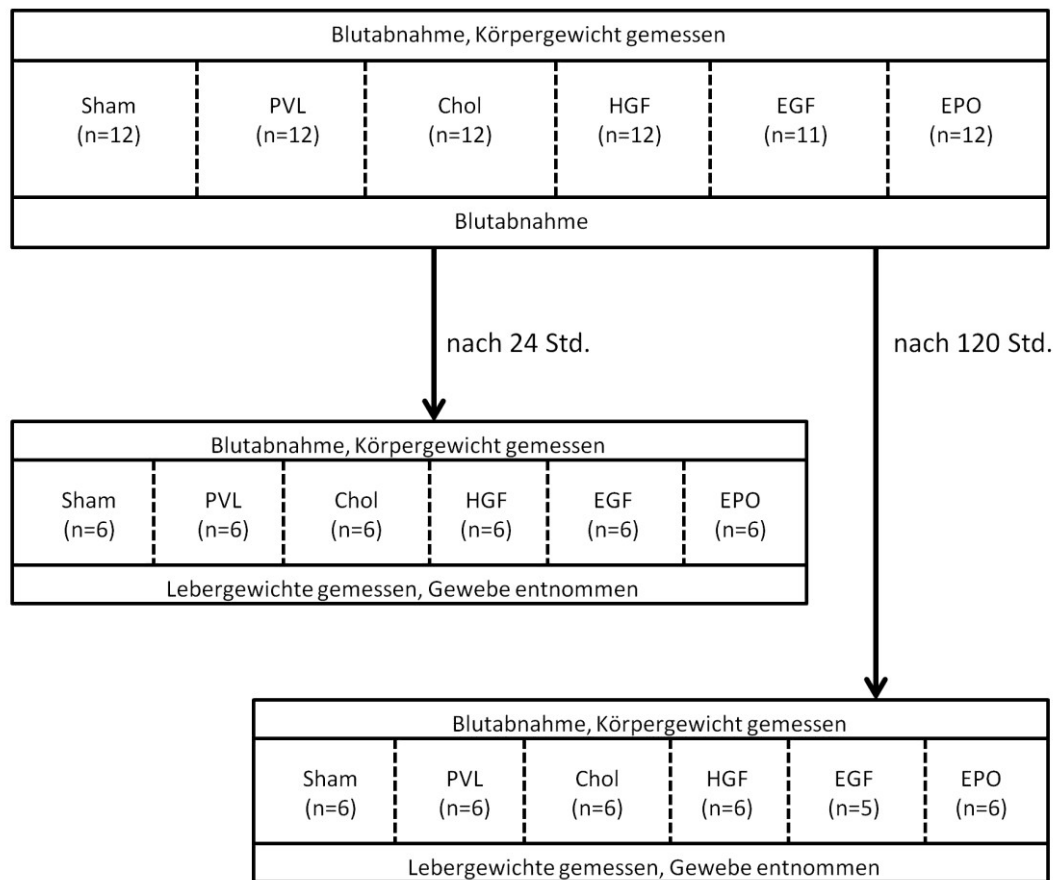
Gruppen	Abkürzung	Nach 24 Std.	Nach 120 Std.
Kontrolle	Sham	n=6	n=6
Pfortaderligatur	PVL	n=6	n=6
Pfortaderligatur mit Cholestase	CHOL	n=6	n=6
Epidermal growth factor	EGF	n=6	n=5
Hepatocyt growth factor	HGF	n=6	n=6
Erythropoetin	EPO	n=6	n=6
Gesamtzahl		n=36	n=35

6.2 Ablauf der Studie

Die Studie wurde im Institut für Tierversuchskunde der Universität Jena durchgeführt. Das Tierexperiment erfüllte alle Auflagen des Tierschutzgesetzes. Alle Ratten wurden artgerecht gehalten und mit Wasser und Pelletstandardfutter versorgt. Nach mindestens sieben Tagen zur Eingewöhnung im Institut wurden die Operationen an den Ratten durchgeführt.

Alle Tiere wurden zweimal narkotisiert und operiert. Die 2. Operation fand bei der Hälfte jeder Tier-Gruppe nach 24 und bei der anderen Hälfte jeder Gruppe nach 120 Stunden statt (Abb. 1).

Abb. 1: Studiendesign



Die Tiere wurden durch Inhalation von 1,25 – 2,0 Prozent Isofluran bei einer Sauerstoffdurchflussrate von 1,5 l/min betäubt. Das Isofluran-Narkosegerät war ein Vaporizer von der Firma Medizintechnik Leipzig, Medimorphsystem. Vor der 1. Operation wurde das präoperative Gewicht in Gramm gemessen und danach eine Identifikationsmarkierung durchgeführt. Danach wurde Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und mit einer dünnen Glaslanzette in ein Eppendorf-Gefäß getropft. Unter Narkose wurde die Ratte im Operationsgebiet vom Xiphoid bis zum Schambein rasiert, mit Povidon-Iod (Betaisodona® Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) desinfiziert und mit den Vorder- und Hinterpfoten an der Operations-Platte fixiert. Während der ersten Narkose wurde unter strikten sterilen Kautelen gearbeitet. Die Tiefe der Narkose wurde

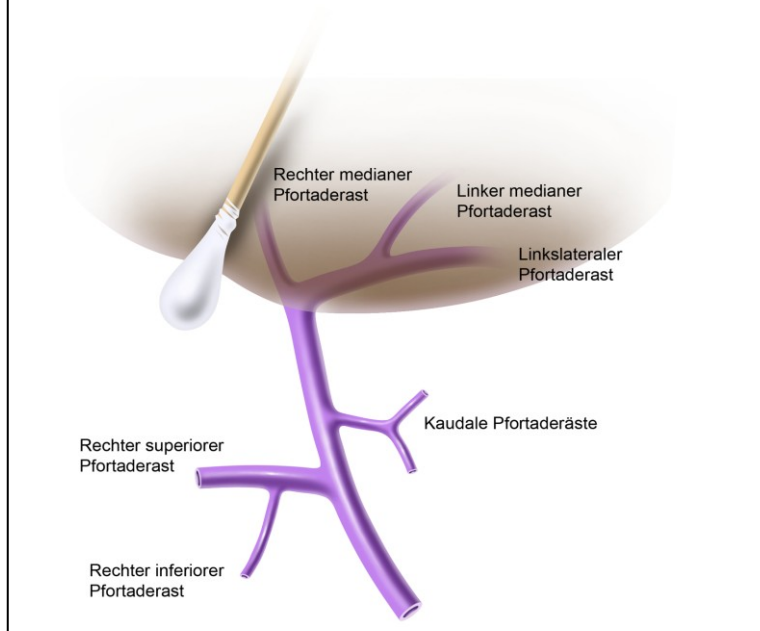
durch Schmerzreize überprüft, bevor die Haut in der Mittellinie vom Xiphoid bis zum Nabel inzidiert wurde. Danach wurde die Faszie durchtrennt und die Bauchhöhle eröffnet.

Unter Sicht wurden die Anatomie der Rattenleber vorsichtig exploriert sowie die Verzweigung der Pfortaderäste und die Lage zum Gallengang identifiziert.

Die Leber der Ratte besteht aus vier Lappen. Der linke Lappen befindet sich dorso-kaudal zum medianen und kranio-ventral zum kaudalen Lappen sowie zum Magen. Der mediane Lappen wird durch eine tiefe Fissur in zwei Teile getrennt. Er befindet sich unter dem Diaphragma und ist mit dem Ligamentum falciforme verbunden. Dieser Lappen umschließt fast die gesamte Gefäßwand der Vena cava. Der rechte Leberlappen ist dorsal mit dem Ligamentum hepatodiaphragma verbunden. Der rechte Lappen berührt sowohl das Diaphragma als auch die Vena cava. Der kaudale Leberlappen befindet sich auf der linken Seite der V. cava und unterhalb des linken Lappens.

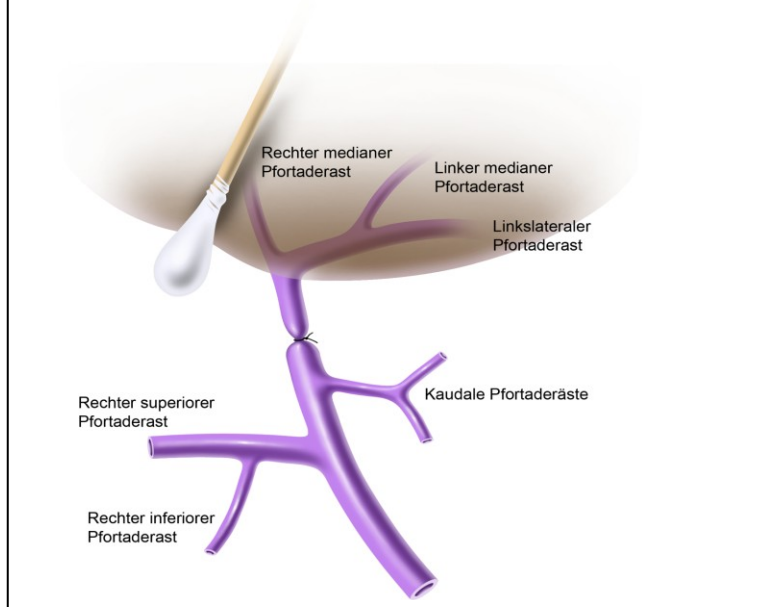
Der erste Ast der Pfortader ist die rechte Portalvene, die in den gleichnamigen Lappen fließt. Der zweite Ast ist die kaudale Portalvene und fließt von links in den gleichnamigen Lappen. Die Hauptbifurkation teilt sich in die rechte, mediane Portalvene und in die linke Portalvene. Die rechts-mediane Pfortader fließt in den rechts-medianen Lappen. Die linke Portalvene zweigt sich sofort auf und fließt als links-medianer Ast und als linker Ast in die gleichnamigen Leberlappen. Die A. hepatica folgt dem Astverlauf der Pfortader in der Leber. Die Vv. hepaticae unterteilen sich in die linke, links-mediane, die mittlere-mediane, rechts-mediane, die rechte, sowie die kaudale Vene. Der Gallengang mündet 2 cm hinter dem Pylorus in das Duodenum (Abb. 2).

Abb. 2: Pfortaderaufteilung (schematisch), Zeichnung von Herrn Jens Geiling, Institut für Anatomie, FSU Jena



In der Sham-Gruppe wurde nur das Lig. falciforme oberhalb der Leber durchtrennt und das Abdomen wieder verschlossen. Bei allen anderen Gruppen wurde der gemeinsame Pfortaderast aufgesucht, der den linken und medianen Leberlappen versorgt, die geeignete Stelle am Pfortaderast freipräpariert und mit einem 6-0 Polyglaktinfaden (Vicryl®, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Die Ligatur erfolgte unter Verwendung eines Stereomikroskops (Zeiss OPMI 1-FR, Deutschland), um versehentliche Unterbindungen von Ästen der Gallengänge bzw. von Ästen der A. hepatica zu vermeiden. Somit wurde eine Ligatur erreicht, die die Leber in einen nicht-ligierten Teil mit ungefähr 30 Prozent und einen ligierten Teil mit der linken und medianen Leber von 70 Prozent trennt (Abb. 3).

Abb. 3: Pfortaderligatur der medianen und linkslateralen Pfortaderäste (schematisch), Zeichnung von Herrn Jens Geiling, Institut für Anatomie, FSU Jena



In einer Gruppe (Cholestase) wurde der Gallengang zusätzlich am Hauptstamm oberhalb der Mündung des Pankreasganges ligiert.

In den Wachstumsfaktoren-Gruppen wurde kein Gallengang ligiert und nach der Pfortaderligatur die 3 jeweiligen Wachstumsfaktoren in die Pfortader unterhalb der Ligatur appliziert. Die Menge des Wachstumsfaktors wurde in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Ratte bestimmt. Nach der Ligatur wurden entweder 100 µg/kg Epidermal growth factor (Mitchell et al. 2005) oder 200 µg/kg Hepatocyte growth factor (Hasuike et al. 2005) oder 10 µg/kg Erythropoetinderivat Darbepoetin alfa (Aranesp®) (Le Minh et al. 2007) in die Portalvene injiziert. Der Situs wurde auf Blutungen kontrolliert. Bei allen 35 Tieren, bei denen eine portalvenöse Applikation durchgeführt wurde, wurde zusätzlich ein 1x1 cm²-Stück resorbierbarer Gelatineschwamm (Gelaspon®, Chauvin Ankerpharm, Berlin) zur Blutstillung eingelegt. Danach wurden alle Tiere zweischichtig mit fortlaufender Fasziennaht und mit Einzelknopfnähten der Haut verschlossen. Als Nahtmaterial wurde nichtresorbierbares Nylon (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt) der Stärke 3-0 verwendet. Der Ratte wurde danach erneut Blut in oben

beschriebener Art und Weise abgenommen. Zum Schutz wurde ein Aluminium-Verband-Spray auf die Wunde gesprüht und das Tier in einen separaten Käfig gelegt, um aus der Narkose aufzuwachen. Es hatte freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Das Blut wurde zwischenzeitlich zentrifugiert, das Serum abpipettiert, beschriftet und in einem -20°C Kühlschrank eingefroren.

Die Relaparotomie wurde unter semisterilen Kautelen entweder nach 24 oder 120 Stunden vorgenommen. Das Tier wurde durch Inhalation von Isofluran betäubt und danach gewogen. Eine dritte Blutprobe wurde aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Die Ratte wurde am Operationsplatz mit Klebepflasterstreifen unter maximaler Narkose fixiert und das Abdomen durch die zum Teil verheilte Narbe wiedereröffnet. Nach sorgfältiger und vorsichtiger Exploration der Bauchhöhle wurde die Leber stumpf vom umgebenden Gewebe abgelöst. Mit jeweils einer Klemme wurden die Vena cava superior, Vena cava inferior und die Strukturen des Leberhilus unterbunden. Mit einer Feingewebsschere wurden die Gefäße unterhalb der Klemme durchtrennt und die Leber stumpf von ihren letzten Verklebungen bzw. Bändern durchtrennt und entnommen. Das Tier wurde danach unter tiefster Betäubung durch eine Mitarbeiterin des Instituts für Tierversuche der Universität Jena eingeschläfert. Die Ratten werden nach den Regeln des Instituts für Versuchstierkunde der Universität Jena entsorgt.

Das Feuchtgewicht der Leber wurde gemessen. Von der Leber wurden die ligierten Teile entfernt und das Lebergewicht erneut gemessen. In vorher vorbereiteten, beschrifteten Cryotubes wurden 0,5 x 0,5 cm² große, zufällig ausgesuchte Abschnitte von der ligierten bzw. nicht-ligierten Leber asserviert. Ein Teil wurde sofort nativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In den 1,8 ml Volumen fassenden Cryotubes befanden sich entweder 5%ige Formaldehydlösung, 2,5%ige Glutaraldehyd oder RNAlater (RNA stabilization reagent) von der Firma Ambion (Austin, Texas). Das Gewebe im Glutaraldehyd wurde bei Raumtemperatur aufrecht stehend aufbewahrt. Das Gewebe im RNAlater wurde nach halbtägigem Einwirken bei Raumtemperatur gelagert. Die Gefäße mit Formaldehyd wurden im Kühlschrank aufbewahrt und die Gefäße mit RNAlater bei -20°C ein-

gefroren. Das native Gewebe wurde im -80°C kalten Gefrierschrank aufbewahrt.

6.3 Untersuchungsmethoden

6.3.1 Gewichte

In der Studie wurde das Gewicht der Tiere, der gesamten Leber und des ligierten Anteils der Leber gemessen. Das Körpergewicht der Tiere wurde in Narkose direkt vor der Intervention und nach 24 bzw. 120 Stunden vor der Leberentnahme in Gramm gewogen.

Bevor das Lebergewicht in Gramm gemessen werden konnte, wurde eine Plastikschaale auf eine Präzisionswaage gelegt und tariert. Nachdem die Leber explantiert worden war, wurde sie vollständig auf die Plastikschaale gelegt und mit der Präzisionswaage gewogen. Anschließend wurde die Leber inspiziert und die nicht-ligierten und ligierten Teile identifiziert. Die Leber wurde entlang des makroskopisch sichtbaren ligierten Anteils geteilt und der ligierte Teil gewogen. Durch Subtraktion des ligierten Gewichtes vom Lebergesamtgewicht konnte das nicht-ligierte Lebergewicht berechnet werden.

Da sich die Körpergewichte und damit auch die Lebergewichte zwischen den Gruppen deutlich unterschieden, wurden die relativen Gewichte des ligierten und nicht-ligierten Anteils in Prozent berechnet. Zusätzlich wurde das Gesamtlebergewicht zum Körpergewicht in Beziehung gesetzt.

6.3.2 Laborwerte

Die Blutproben aller Ratten wurden nach Zentrifugation bei 3,000 rpm für 10 min und nach Abpipettieren der Serums bei -20 Grad Celsius eingefroren und im Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Jena analysiert. Folgende Blutwerte wurden bestimmt: ALAT, GLDH, direktes und gesamtes Biliru-

bin, alkalische Phosphatase, Gesamteiweiß, Kreatinin und Harnstoff. Es wurden nur die Blutwerte nach 120 Stunden und ohne die HGF-Gruppe aufgrund von versehentlicher Fehllagerung ausgewertet.

6.3.3 Histologische Untersuchung

Aus den ligierten und nicht-ligierten Leberabschnitten wurden repräsentative Gewebeproben entnommen und in Formalin asserviert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und mit einem Schlittenmikrotom in 1-2 µm dünne Schnitte geteilt. Dieses Material wurde immunhistochemisch auf das ki-67-Antigen untersucht sowie einer TUNEL-Analyse zugeführt.

Begonnen wurde mit dem Nachweis auf das ki-67-Antigen. Das ki-67-Antigen ist ein Protein des Zellkerns (Gerdes et al. 1984) und findet sich nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus. Bei der G₀-Phase und bei DNA-Reparaturmechanismen kommt das Protein nicht vor, weshalb es sich als Marker für die aktive Proliferation eignet (Key et al. 1994, McCormick et al. 1993).

Hierfür wurde das Gewebe auf einem Objektträger aufgetragen und mithilfe von Xylol und Alkohol entparaffiniert. Bei der ki-67-Methode wurde als nächstes die Antigendemaskierung durch 10-minütiges Kochen im Dampfdrucktopf in einem EDTA-Puffer pH 9,0 durchgeführt. Nachdem die Antigenstruktur freigelegt worden war, erfolgte die Immunfärbung mit den ki-67-Antikörpern mit der Labelled (Strept)Avidin-Biotin-Methode, bei der die Affinität von Avidin zu Biotin genutzt wurde. Im letzten Schritt wurde mit Haematoxylin, Xylol und Alkohol zur Kern-darstellung gefärbt. Nach dem Eindecken mit einem Deckglas war das Präparat fertig zum Mikroskopieren.

Zu Beginn wurden die ki-67-Färbungen unter einer Leica DM LB-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet, wobei einige aufgrund niedriger Schnitt- oder Färbequalität aussortiert wurden. Von jedem verbliebenen Schnitt wurden zehn „Regions of interest“ (ROI) bei einer 200fachen Vergrößerung standardisiert fotografiert. Fünf Fotos bildeten die Zentralvene und das umliegende Leberparenchym ab und die anderen fünf das

Portalfeld mit der Glisson Trias. Als Erkennungs- und Auswertungsprogramm wurde „Analysis auto“ der Firma Olympus verwendet.

Zur Auszählung der insgesamt 1200 Bilder diente ein Macro des Programms „Analysis auto“, das speziell für diese Fragestellung entwickelt wurde und das anhand von Größe, Form und Farbe der Hepatozytenkerne die Gesamtzahl der Hepatozyten und die Zahl der ki-67-positiven Hepatozyten bestimmte. Vorab wurde eine Validierung des Macros durchgeführt. Aus jeweils zehn ROI pro Schnitt wurde der Proliferationsindex (dem Quotienten aus den ki-67-positiven, proliferierenden Hepatozyten zur Gesamtheptozytenzahl) berechnet.

Alle Schnitte wurden histologisch auch nach der TUNEL-Methode untersucht, bei der die Zellkerne apoptotischer Zellen unter dem Lichtmikroskop nachweisbar waren. TUNEL ist die Abkürzung von Terminal desoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labeling. Bei der Apoptose fragmentieren Endonukleasen den DNA-Strang des Zellkerns. An den Bruchenden werden Hydroxygruppen frei und können in situ durch das Enzym Terminal-Desoxynucleotidyltransferase mit markierten Nukleotiden versehen werden, die dann als Marker für Apoptose dienen (Gavrieli et al. 1992).

Für die Analyse wurde das Kit „In Situ Cell Death Detection Kit, POD“ der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Auch hier startete der Prozess mit einer Xylol-Reihe und einer absteigenden Alkoholreihe des auf einen Objektträger aufgetragenen Gewebes, bei der es entparaffiniert und rehydriert wurde. Im Anschluss folgte eine zusätzliche gewebeabhängige Behandlung zur Permeabilisierung und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit H_2O_2 blockiert. Im weiteren Verlauf wurde nach Herstellerprotokoll die TUNEL-Reaktionslösung, Converter-POD und Substratlösung hinzugefügt. Nach dem Eindecken mit einem Deckglas war das Präparat fertig zur mikroskopischen Untersuchung.

Zu Beginn wurden die TUNEL-Färbungen unter einer Leica DM LB-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet, wobei einige aufgrund niedriger Schnitt- oder Färbequalität aussortiert wurden. Von jedem verbliebenen Schnitt wurden zehn „Regions of Interest“ (ROI) bei einer 200fachen Vergrößerung standardisiert fotografiert. Fünf Fotos bildeten die

Zentralvene und das umliegende Leberparenchym ab und die anderen fünf das Portalfeld mit der Glisson Trias. Als Erkennungs- und Auswertungsprogramm wurde „Analysis auto“ der Firma Olympus verwendet.

Bei dem Apoptosemarker TUNEL wurden die Gewebe der Tiere mit einer Nachbeobachtungszeit von 120 Stunden ausgewertet. Zuerst wurden wie oben beschrieben zehn ROIs pro Schnitt fotografiert (560 Fotos). Danach wurden alle Fotos händisch mit Hilfe des „Analysis auto“ Programms der Firma Olympus ausgezählt und ausgewertet. Aus jeweils zehn ROI pro Schnitt wurde der Apoptoseindex (dem Quotienten aus den TUNEL-positiven Hepatozyten zur Gesamtheptozytenzahl) berechnet. Da die Hepatozyten den Hauptanteil des Lebervolumens ausmachen, ist für die makroskopische Atrophie des Leberlappens der Hepatozytenzelltod ausschlaggebend (Greengard et al. 1972).

Die Schnitte und Färbungen wurden im Institut für Pathologie der Universität Bochum (Leitung: Frau Professor Dr. med. A. Tannapfel) hergestellt. Die mikroskopische Analyse wurde durch uns am Institut für experimentelle Transplantationschirurgie unter der Leitung von Frau Professor Dr. med. U. Dahmen an der Universitätsklinik Jena durchgeführt.

6.4 Statistik

Die Studie wurde in drei Teilen ausgewertet. Im ersten Teil wurde die Sham-Gruppe mit der PVL-Gruppe verglichen, um den Effekt der Pfortaderligatur gegenüber der Kontrollgruppe zu überprüfen. Im zweiten Teil wurde die PVL-Gruppe mit der Cholestase-Gruppe verglichen, um den Effekt der Kombination aus Pfortaderligatur und Ligatur des Hauptgallengangs zu untersuchen. Im dritten Teil wurden die Gruppen PVL, EGF, HGF und EPO miteinander verglichen, um den Einfluss der Wachstumsfaktoren zu bestimmen.

In jedem einzelnen Teil wurden eine Nullhypothese (H_0) und eine alternative Hypothese (H_A) aufgestellt und gegeneinander überprüft.

Die Nullhypothese lautete:

H_0 : Es gibt keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

Die alternative Hypothese lautete:

H_A : Es gibt einen Unterschied zwischen den Gruppen.

Als Hauptzielkriterium galt das postinterventionelle Wachstum der nicht-ligierten Leber. Es wurde das Gewicht des nicht-ligierten Leberlappen gemessen und in Beziehung zum gesamten Lebergewicht gesetzt. Das relative Lebergewicht in Prozent wurde zwischen den Gruppen in einem zweiseitigen Signifikanztest verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ festgelegt. Als weitere Nebenzielkriterien der Studie galten leberspezifische Blutwerte sowie die histologische Auszählung von Proliferations- und Tumormarkern der Leber.

Alle Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingegeben. Die Daten wurden in SPSS Ver. 19 (Chicago, Illinois, USA) eingelesen und ausgewertet. Die Ergebnisse der deskriptiven Analyse numerischer Werte werden als Median und Bereich angegeben. Die Werte der einzelnen Gruppe wurden als Box-and-Whisker-Plots mit einer 5%-95%-Perzentile dargestellt. Kategorische Werte wurden in Häufigkeiten angegeben.

In jedem einzelnen Teil wurden die numerischen Werte zwischen den Gruppen mit nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests (zwei Gruppen) oder Kruskal-Wallis-Tests (vier Gruppen) verglichen. Kategoriale Parameter wurden mit dem Fisher's exakt Test vorgenommen. Als Signifikanzniveau galt immer $\alpha=0,05$. Es wurde keine Anpassung des Signifikanzniveaus durch die Mehrfachtestung vorgenommen.

7 Ergebnisse

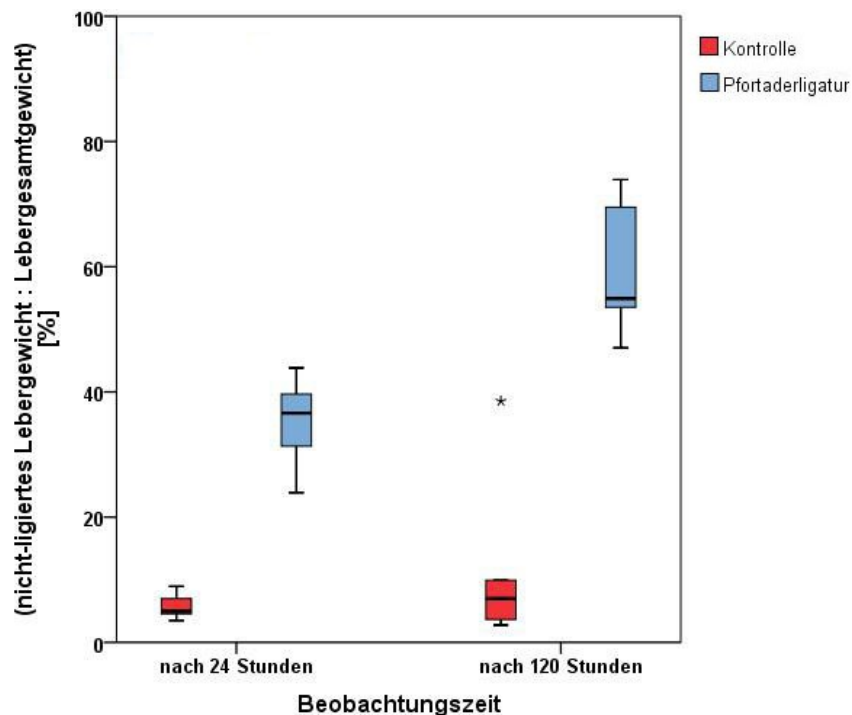
In die Auswertung der Studie wurden 71 Tiere aufgenommen. Das Ausgangsgewicht aller Tiere (n=71) betrug 374 g (287-580 g).

7.1 Pfortaderligatur und Kontrolle

7.1.1 Gewichte

Im ersten Teil wurde die Sham-Gruppe mit der PVL-Gruppe nach 24 und 120 Stunden verglichen (Mann-Whitney-Test). Zwischen den beiden Gruppen bestand ein Unterschied ($p < 0,05$) bereits im Körpergewicht, so dass die absoluten Werte nicht aussagekräftig waren. Deshalb wurden die Relativgewichte verglichen.

Abb. 4 : Vergleich des Quotienten aus dem nicht-ligierten Lebergewicht und dem Lebergesamtwicht zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur nach 24 und 120 Stunden

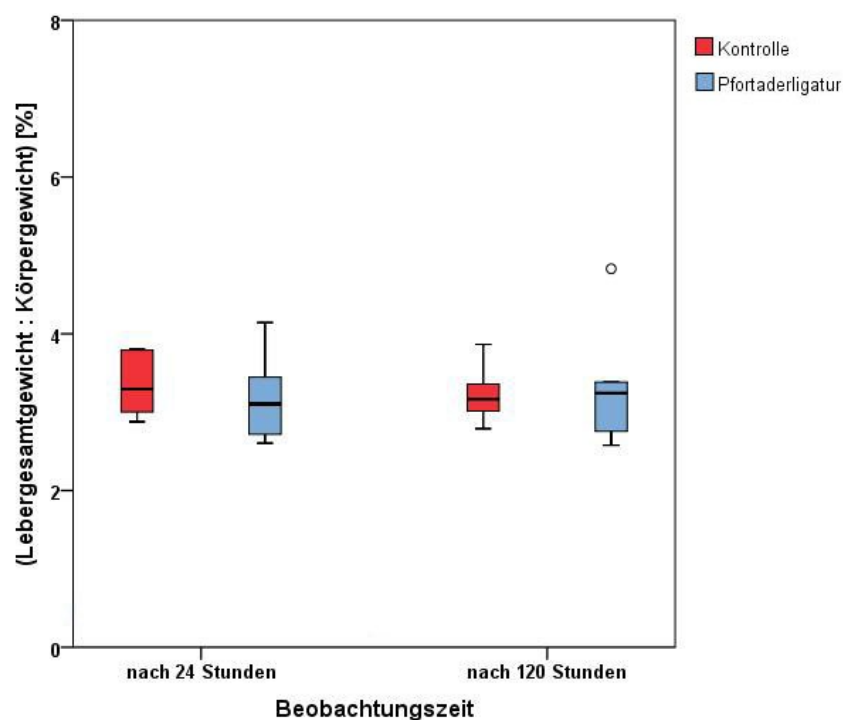


Das Verhältnis des nicht-ligierten Lebergewicht zum Lebergesamtwgewicht in Prozent ist in Abbildung 4 dargestellt. In der Sham-Gruppe wurden die ligaturkorrespondierenden Leberlappen als nicht-ligiertes Lebergewicht verwendet.

Es zeigte sich sowohl nach 24 Stunden ($p=0,004$) als auch nach 120 Stunden ein Unterschied ($p=0,004$). Dasselbe trifft auch auf den Anteil der ligierten Leber am Lebergesamtwgewicht in Prozent zu. Sowohl nach 24 Stunden ($p=0,004$) als auch nach 120 Stunden ($p=0,004$) waren die Werte deutlich unterschiedlich.

Der Quotient aus dem Lebergewicht zum Körpergewicht (Abb. 5) war nach 24 Stunden ($p=0,5$) und nach 120 Stunden ($p=1,0$) nicht verschieden.

Abb. 5: Vergleich des Quotienten aus dem Lebergesamtwgewicht und dem Körpergewicht zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur nach 24 und 120 Stunden



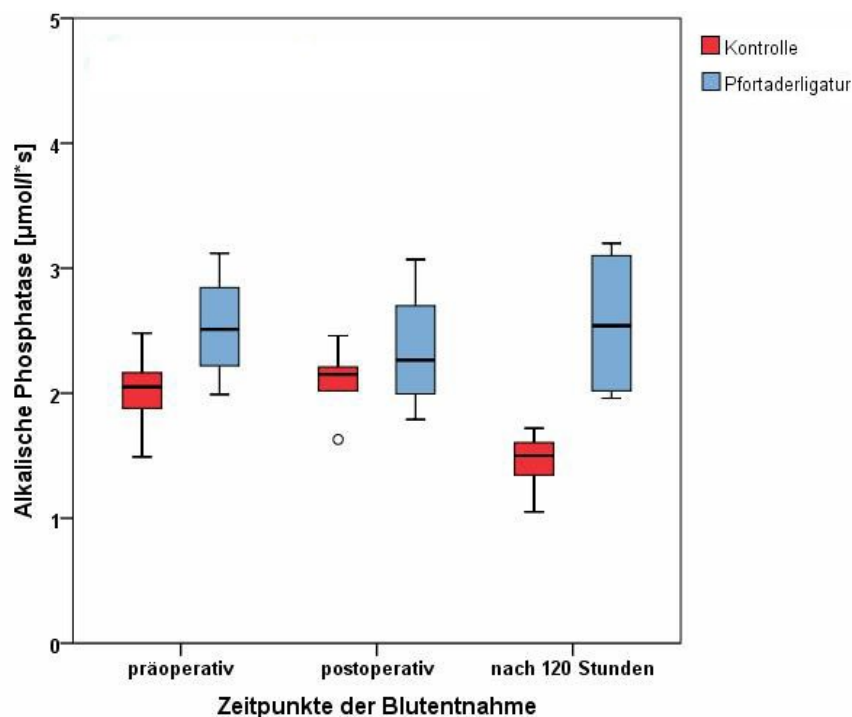
7.1.2 Laborwerte

Die Laborwerte wurden in allen drei Blutproben präoperativ, direkt postoperativ und postoperativ nach 120 Stunden gemessen. Gesamteiweiß, Kreatinin und

Harnstoff wurden bestimmt und ergaben weder Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p>0,3$) noch zwischen den beiden zu betrachtenden Gruppen ($p>0,3$) (Tab. 3-5 im Anhang).

Die alkalische Phosphatase war in beiden Gruppen nur nach 120 Stunden verschieden ($p=0,01$) und unterschied sich nicht im Verlauf ($p=0,25$) (Abb. 6).

Abb. 6: Vergleich der alkalischen Phosphatase zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur zu verschiedenen Zeitpunkten



Postoperativ erhöhten sich die ALAT–Werte in beiden Gruppen ($p=0,02$), wobei die Werte in der PVL höher stiegen ($p=0,025$). In der Kontrolle sank der Wert innerhalb von 120 Stunden wieder auf präoperative Werte, während die Werte in der PVL weiter erhöht blieben (Abb. 7).

Das direkte (Tab. 2 im Anhang) und gesamte Bilirubin (Abb. 8) war lediglich direkt postoperativ in der PVL erhöht ($p=0,01$).

Abb. 7: Vergleich der ALAT-Werte zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur zu verschiedenen Zeitpunkten

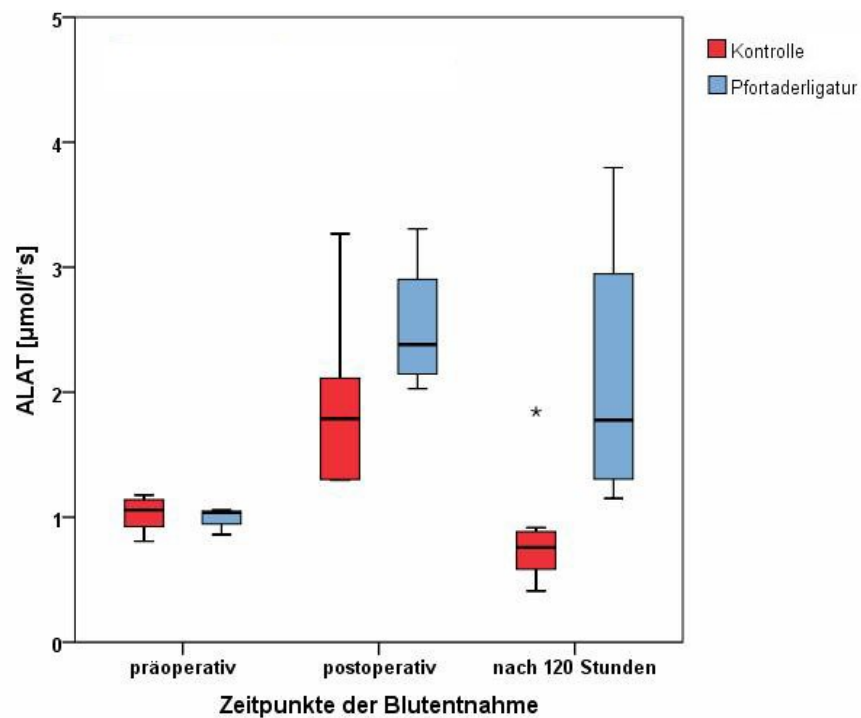
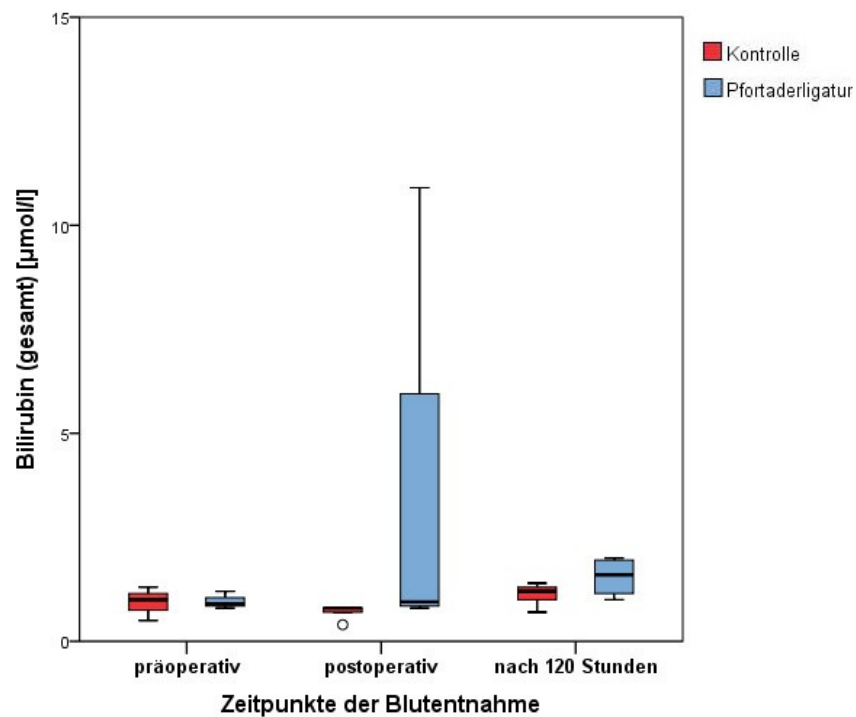
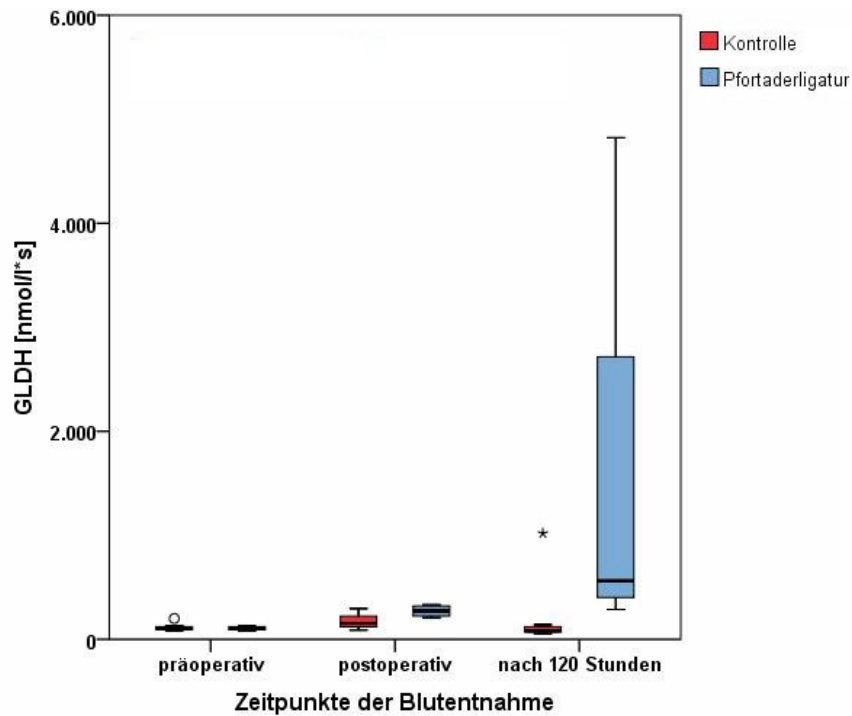


Abb. 8: Vergleich des gesamten Bilirubins zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur zu verschiedenen Zeitpunkten



Die GLDH stieg nur nach 120 Stunden in der PVL ($p=0,1$) (Abb. 9).

Abb.9: Vergleich der GLDH-Werte zwischen der Kontrolle und der Pfortaderligatur zu verschiedenen Zeitpunkten



7.1.3 Histologie

Der ki-67-Index stieg in der PVL sehr stark an (Abb. 10). Selbst die ligierten Abschnitte der PVL zeigten einen höheren ki-67-Index ($p<0,001$) als die Kontrolle. Der Index war nach 24 und 120 Stunden vergleichbar ($p>0,5$) (Abb. 11).

Abb. 10: Beispielhafte Fotos der ki-67-Färbungen vom nicht-ligierten Leberabschnitt und ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von der Kontrolle und der Pfortaderligatur. Bei der ki-67-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Blautönen, wobei Zellkerne in Proliferation violettrot erscheinen.

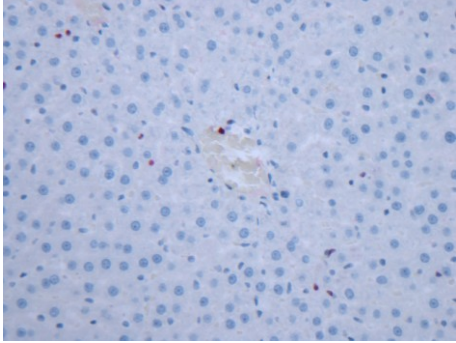
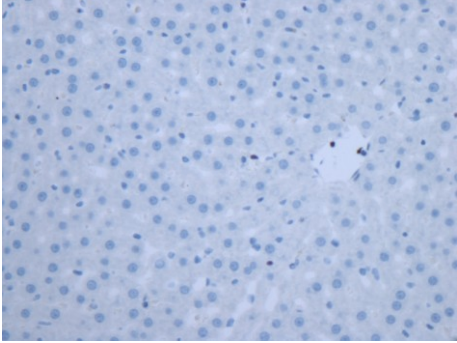
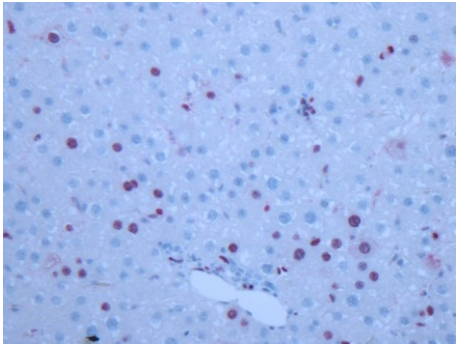
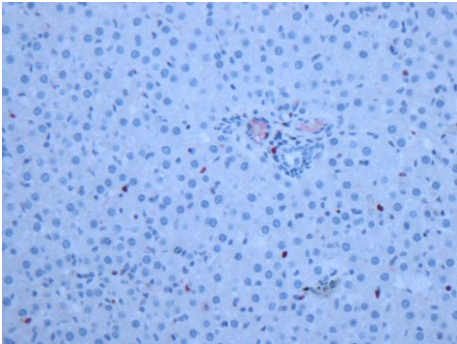
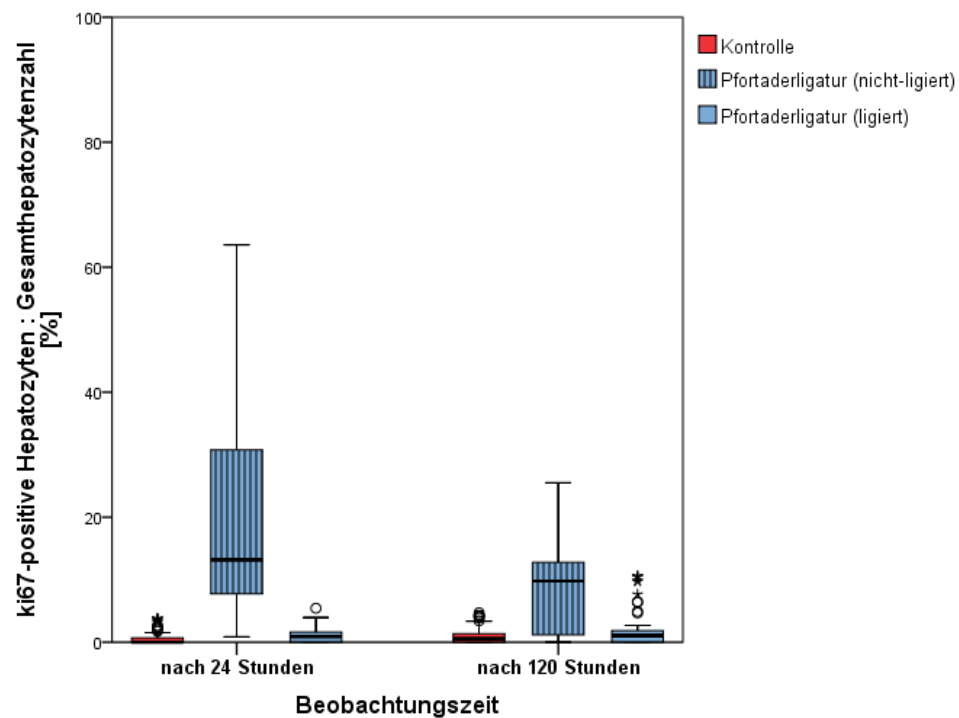
	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
Kontrolle		
PVL		

Abb. 11: Vergleich der ki-67-Indices zwischen der Pfortaderligatur und der Kontrolle im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen nach 24 und 120 Stunden



In der Kontrolle und im nicht-ligierten Abschnitt der PVL besteht kein Unterschied in der Apoptose ($p=0,8$) (Abb. 12). In den ligierten Abschnitten der PVL ist sie dagegen im Vergleich hoch ($p<0,001$) (Abb. 13).

Abb. 12: Beispielhafte Fotos der TUNEL-Färbungen vom nicht-ligierten Leberabschnitt und vom ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von der Kontrolle und der Pfortaderligatur. Bei der TUNEL-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Grautönen, wobei Zellkerne in Apoptose dunkelbraun erscheinen.

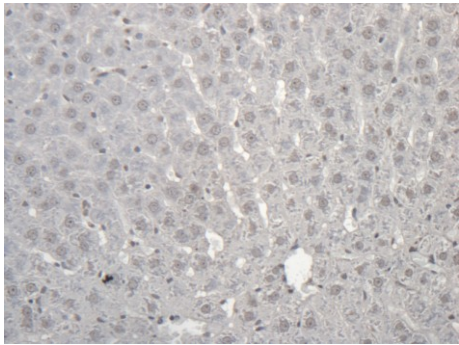
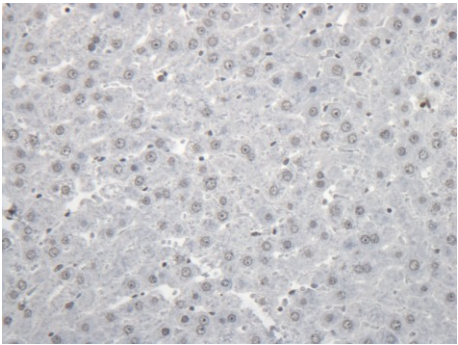
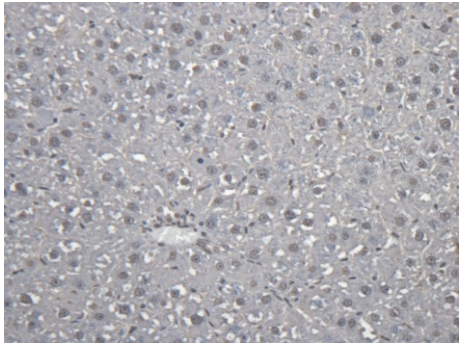
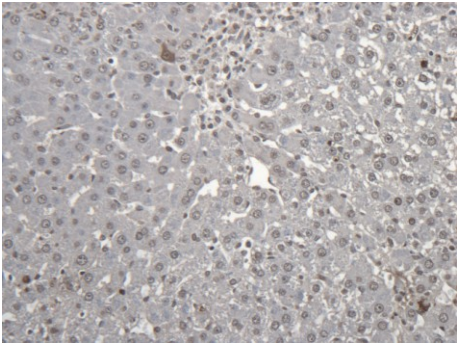
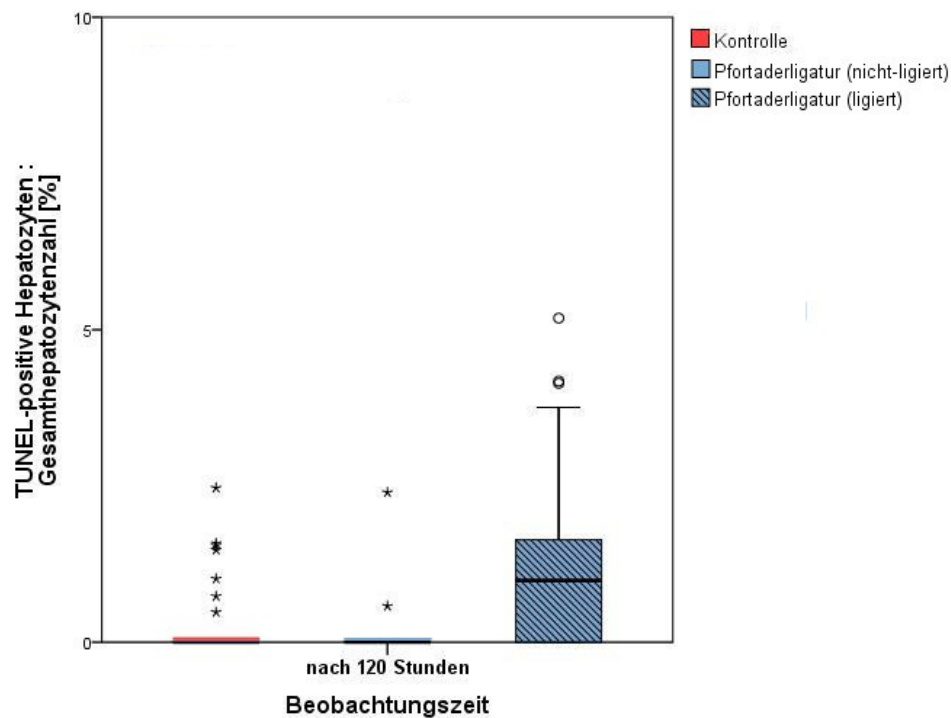
	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
Kontrolle		
PVL		

Abb. 13: Vergleich der TUNEL-Indices zwischen der Pfortaderligatur und der Kontrolle im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen nach 120 Stunden



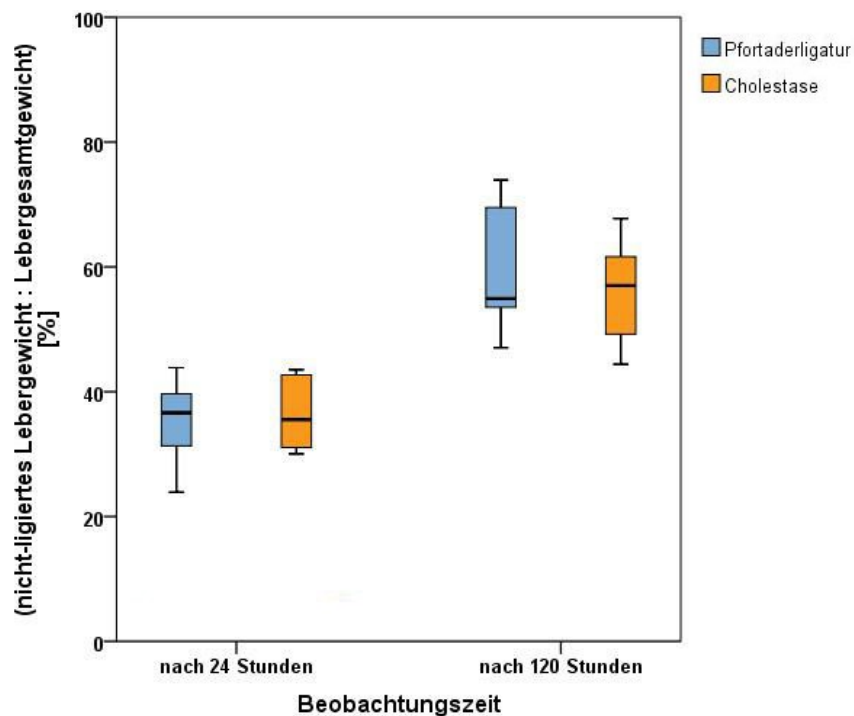
7.2 Pfortaderligatur mit und ohne Cholestase

7.2.1 Gewichte

Im zweiten Teil wurde die Pfortaderligatur (PVL) mit der Pfortaderligatur in Kombination mit der Cholestase (Cholestase) nach 24 und 120 Stunden verglichen. Zwischen den beiden Gruppen bestand ebenfalls ein Unterschied ($p < 0,05$) im Körpergewicht, so dass die absoluten Werte nicht aussagekräftig waren. Deshalb wurden die Relativgewichte verglichen. Das Verhältnis des nicht-ligierten Lebergewicht zum Lebergesamtgewicht in Prozent (Abb. 14) zeigte nach 24 Stunden ($p = 1,0$) und auch nach 120 Stunden ($p = 0,63$) keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Nach 120 Stunden hatte das nicht-ligierte

Lebergewicht in der PVL ($p=0,004$) und auch in der mit Cholestase ($p=0,004$) zugenommen.

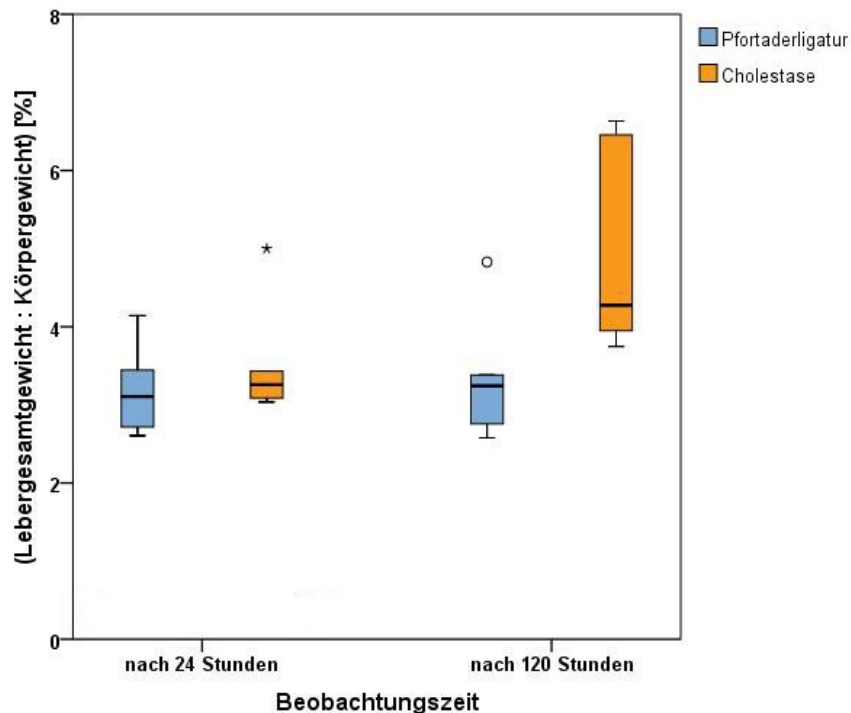
Abb.14: Vergleich des Quotienten aus dem nicht-ligierten Lebergewicht und dem Lebergesamtgewicht zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase nach 24 und 120 Stunden



Auch der Anteil der ligierten Leber am Lebergesamtgewicht in Prozent war beim Vergleich beider Gruppen sowohl nach 24 Stunden ($p=1,00$) als auch nach 120 Stunden ($p=0,63$) nicht verschieden.

Der Quotient aus dem Lebergewicht zum Körpergewicht (Abb. 15) war nach 24 Stunden ($p=0,52$) nicht verschieden, jedoch fiel zwischen den Gruppen nach 120 Stunden ($p=0,13$) ein geringer Unterschied auf.

Abb.15: Vergleich des Quotienten aus dem Lebergesamtwicht und dem Körpergewicht zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase nach 24 und 120 Stunden

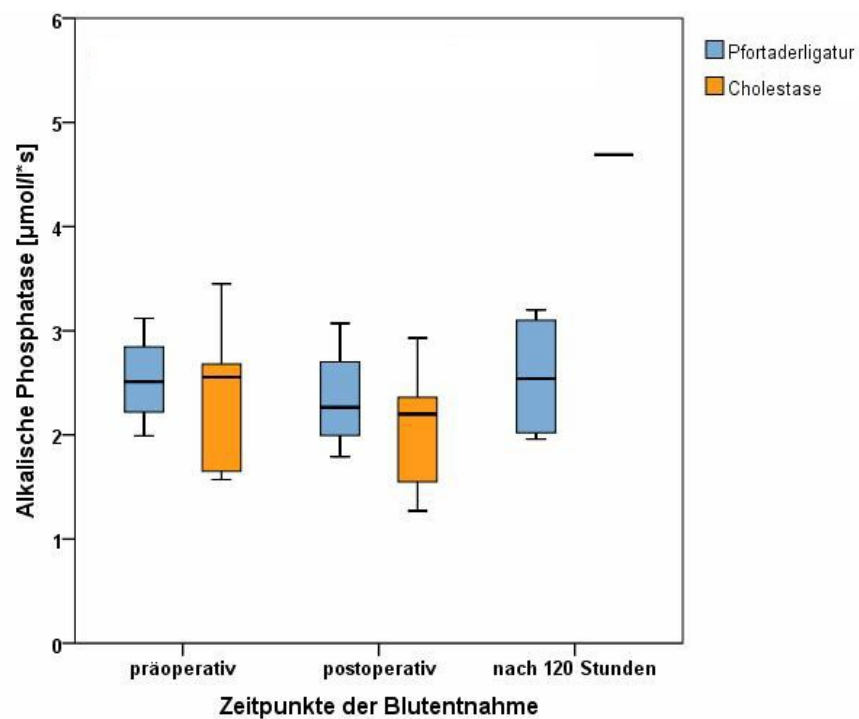


7.2.2 Laborwerte

Die Laborwerte wurden in allen drei Blutproben präoperativ, direkt postoperativ und postoperativ nach 120 Stunden gemessen. Gesamteiweiß, Kreatinin und Harnstoff wurden bestimmt und ergaben weder Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p > 0,3$) noch zwischen den beiden zu betrachtenden Gruppen ($p > 0,3$) (s. Tab. 3-5 im Anhang).

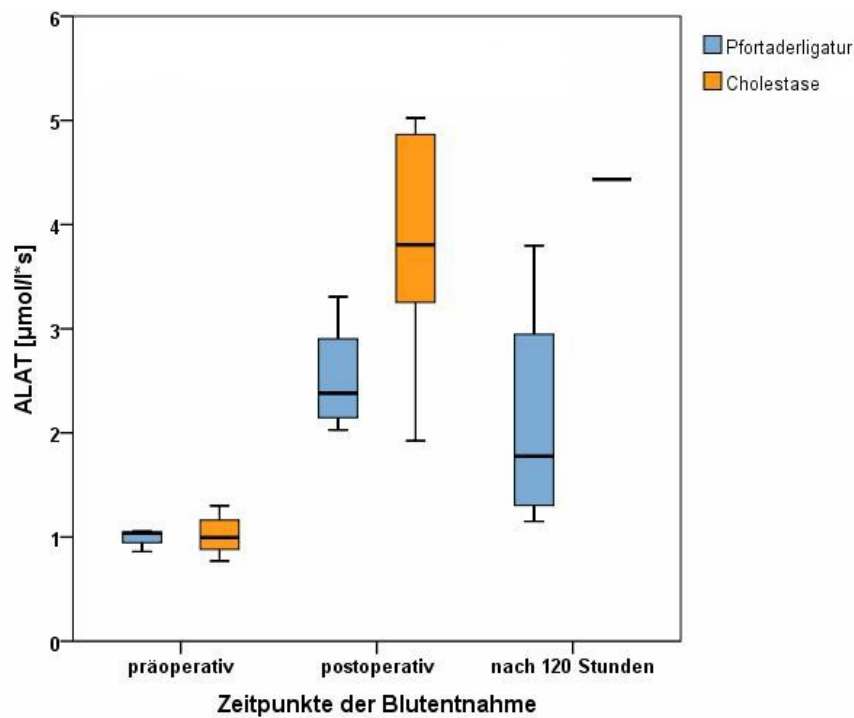
Zwischen PVL und Cholestase zeigte die alkalische Phosphatase keinen Unterschied prä- und postoperativ ($p > 0,3$), jedoch nach 120 Stunden war sie in der Cholestase angestiegen (Abb. 16).

Abb.16: Vergleich der alkalischen Phosphatase zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase zu verschiedenen Zeitpunkten



Die ALAT-Werte stiegen postoperativ in beiden Gruppen an ($p=0,001$) (Abb. 17), wobei die Werte in der Cholestase noch höher waren ($p=0,095$).

Abb.17: Vergleich der ALAT-Werte zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase zu verschiedenen Zeitpunkten



Sowohl das direkte (Tab. 2 im Anhang) als auch das gesamte Bilirubin (Abb. 18) stiegen postoperativ ($p<0,002$). In der Cholestase-Gruppe war das direkte ($p=0,08$) und das gesamte Bilirubin ($p=0,28$) höher als in der PVL. Die GLDH stieg postoperativ an ($p=0,001$). Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht nachweisbar ($p=0,2$) (Abb. 19).

Abb. 18: Vergleich des gesamten Bilirubins zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase zu verschiedenen Zeitpunkten

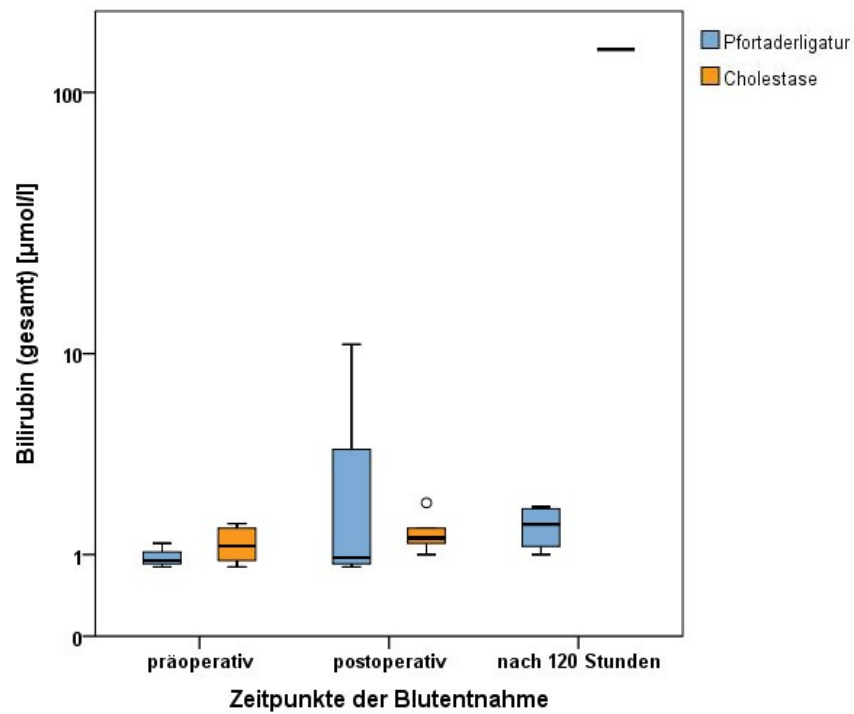
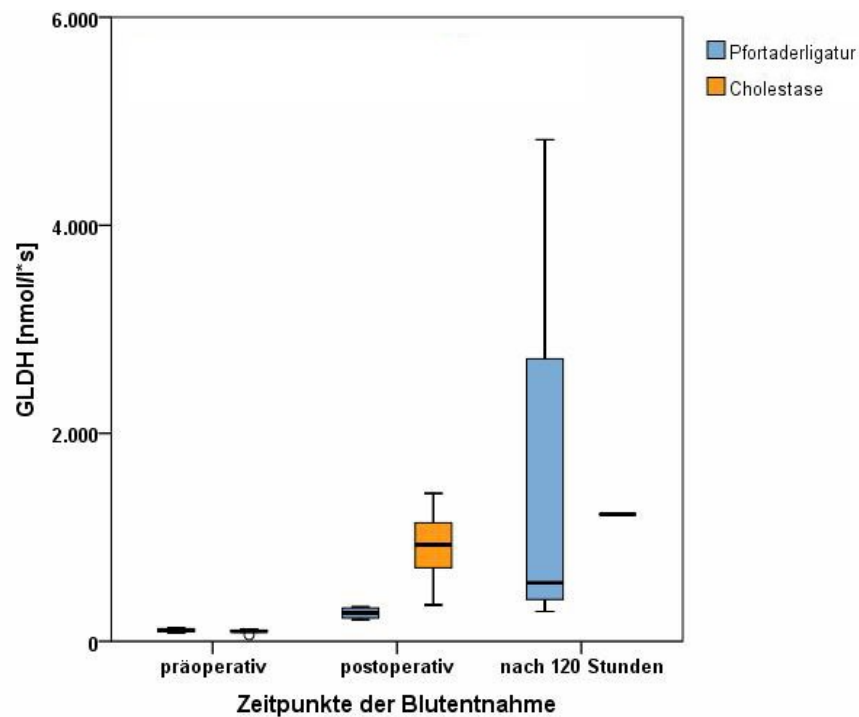


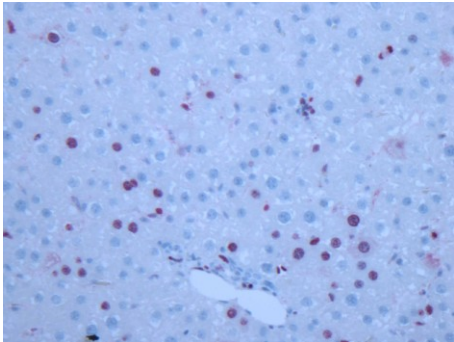
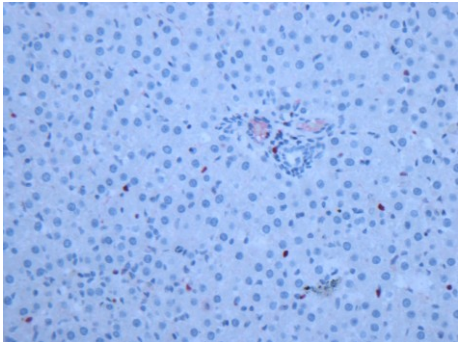
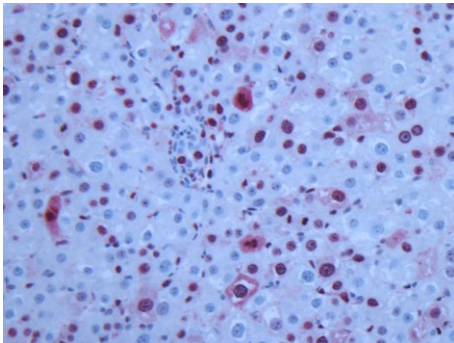
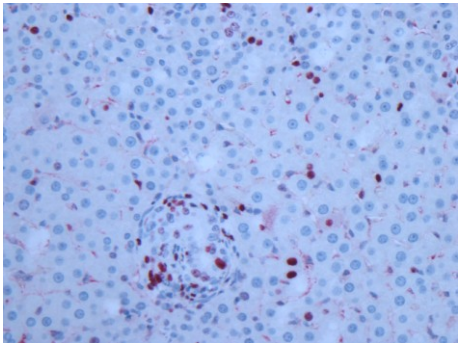
Abb. 19: Vergleich der GLDH-Werte zwischen der Pfortaderligatur und der Cholestase zu verschiedenen Zeitpunkten



7.2.3 Histologie

Der ki-67-Index war nach 120 Stunden höher als nach 24 Stunden ($p=0,003$) (Abb. 20). In den nicht-ligierten Abschnitten war der Index in der Pfortaderligatur deutlich höher ($p=0,001$), aber nach 120 Stunden war die Cholestase wiederum höher ($p<0,001$). In den ligierten Abschnitten unterschieden sich PVL und Cholestase nicht ($p=0,48$) und auch im zeitlichen Verlauf war der Index vergleichbar ($p=0,13$) (Tab. 6).

Abb. 20: Beispielhafte Fotos der ki-67-Färbungen vom nicht-ligierten Leberabschnitt und vom ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von PVL und PVL mit Cholestase. Bei der ki-67-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Blautönen, wobei Zellkerne in Proliferation violettrot erscheinen.

	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
PVL		
PVL mit Cholestase		

Tab. 6: ki-67-Indices im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen im Median (Range) bei der Pfortaderligatur und der Cholestase nach 24 und 120 Stunden

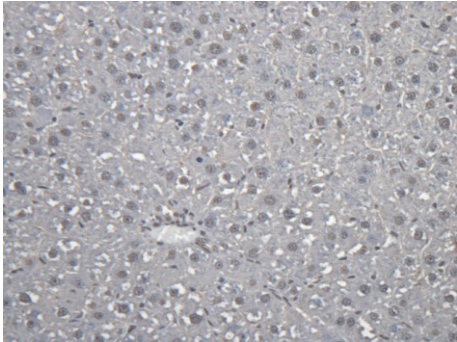
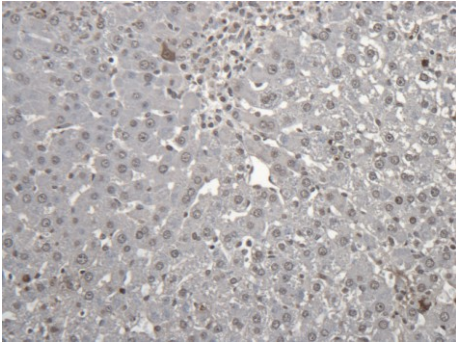
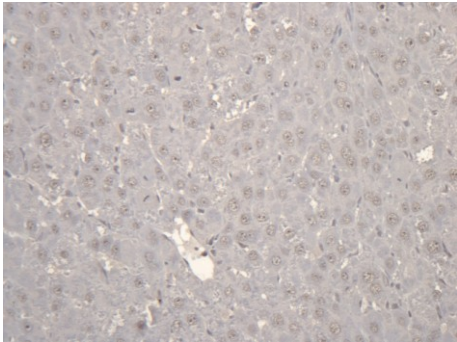
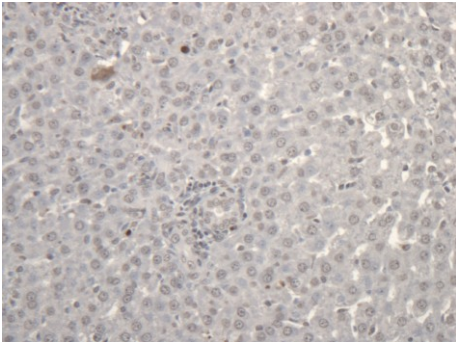
	ki-67 positive Hepatozyten im nicht-ligierten Leberlappen [%]	ki-67 positive Hepatozyten im ligierten Leberlappen [%]
24 STUNDEN		
PVL	13,2 (0,9-63,6)	0,9 (0,0-5,4)
Cholestase	4,7 (0,0-21,2)	0,8 (0,0-5,1)
120 STUNDEN		
PVL	9,8 (0,0-25,5)	1,1 (0,0-10,6)
Cholestase	34,9 (0,6-63,7)	3,7 (0,4-10,8)

Die Apoptoserate unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ($p=0,6$) (Abb. 21). Lediglich in den ligierten Abschnitten war sie in der PVL etwas höher ($p=0,06$). In den nicht-ligierten Abschnitten war die Apoptose zwischen den Gruppen vergleichbar ($p=0,28$) (Tab. 7).

Tab. 7: TUNEL-Indices im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen im Median (Range) bei der Pfortaderligatur und der Cholestase nach 120 Stunden

	TUNEL positive Hepatozyten im nicht-ligierten Leberlappen [%]	TUNEL positive Hepatozyten im ligierten Leberlappen [%]
120 STUNDEN		
PVL	0,0 (0,0-2,4)	1,0 (0,0-5,2)
Cholestase	0,0 (0,0-1,2)	0,6 (0,0-2,7)

Abb. 21: Beispielhafte Fotos der TUNEL-Färbungen vom nicht-ligierten Leberabschnitt und vom ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von PVL und PVL mit Cholestase. Bei der TUNEL-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Grautönen, wobei Zellkerne in Apoptose dunkelbraun erscheinen.

	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
PVL		
PVL mit Cholestase		

7.3 Pfortaderligatur mit und ohne Wachstumsfaktoren

7.3.1 Gewichte

Im dritten Teil wurde die einfache Pfortaderligatur (PVL) mit der Pfortaderligatur mit jeweils drei verschiedenen Wachstumsfaktoren (EGF, HGF und EPO) nach 24 und 120 Stunden verglichen (Kruskal-Wallis-Test). Zwischen den vier Grup-

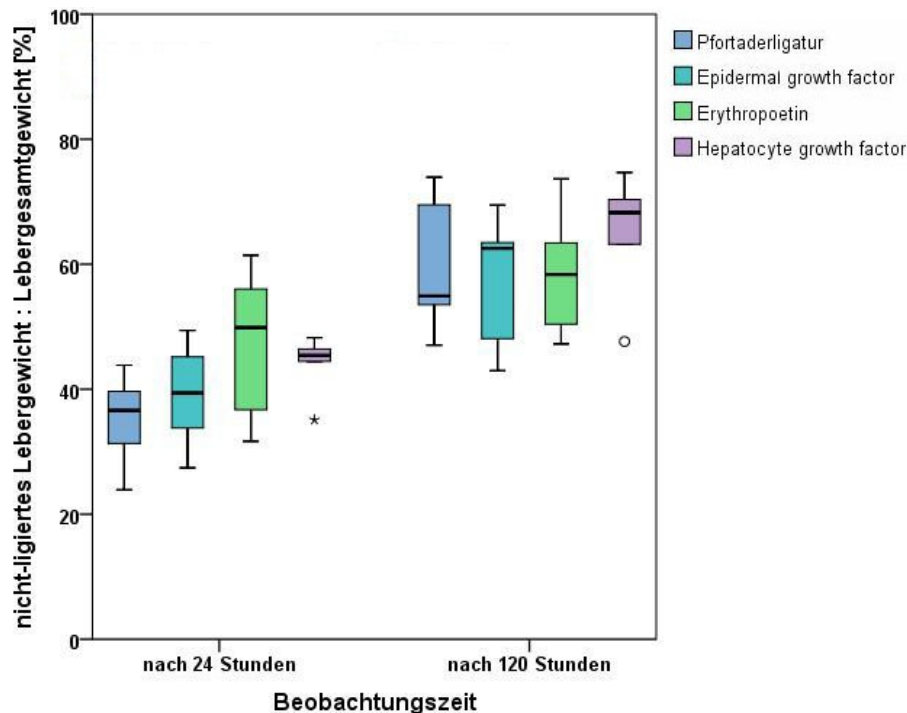
pen bestand bereits im Körpergewicht ein Unterschied ($p < 0,05$), so dass die absoluten Werte nicht aussagekräftig waren. Deshalb wurden die Relativgewichte verglichen (Tab. 8).

Tab. 8: Lebergewichte im Median (Range) bei der Pfortaderligatur, HGF, EGF und EPO nach 24 Stunden und 120 Stunden

	Lebergesamtgewicht (g)	nicht-ligiertes Lebergewicht (g)	ligiertes Lebergewicht (g)	Nicht-ligiertes Lebergewicht : Lebergesamtgewicht (%)
24 STUNDEN				
PVL	14,4 (11,2-18,0)	5,0 (4,1-6,0)	9,0 (6,3-13,7)	36,6 (23,9-43,8)
HGF	10,0 (9,2-13,7)	4,6 (4,2-4,9)	5,5 (4,8-8,9)	45,4 (35,1-48,2)
EGF	14,8 (9,3-18,2)	6,4 (2,5-7,5)	8,1 (6,7-11,3)	39,4 (27,4-49,4)
EPO	10,8 (9,1-13,3)	4,8 (3,5-7,2)	5,5 (4,0-9,1)	49,9 (31,7-61,4)
120 STUNDEN				
PVL	10,0 (8,4-14,1)	6,0 (4,5-7,7)	4,1 (2,7-6,5)	54,9 (47,1-73,9)
HGF	11,6 (9,0-16,8)	7,7 (6-9,3)	3,2 (3,0-8,8)	68,3 (47,6-74,7)
EGF	10,9 (10,7-16,8)	7,6 (4,7-9,2)	5,5 (3,3-8,7)	62,5 (43,0-69,5)
EPO	11,4 (8,6-21,5)	7,2 (4,0-10,8)	4,9 (2,5-10,7)	58,3 (47,3-73,7)

Beim Verhältnis des nicht-ligierten Lebergewichtes zum Lebergesamtgewicht in Prozent (Abb. 22) zeigte sich innerhalb der Gruppen nach 24 Stunden ($p=0,11$) und auch nach 120 Stunden ($p=0,45$) kein Unterschied. Allerdings nahm das Gewicht nach 120 Stunden zu ($p < 0,001$). Beim direkten Vergleich von HGF mit PVL zeigte sich ein Unterschied nach 24 Stunden ($p=0,03$), jedoch nicht mehr nach 120 Stunden ($p=0,3$).

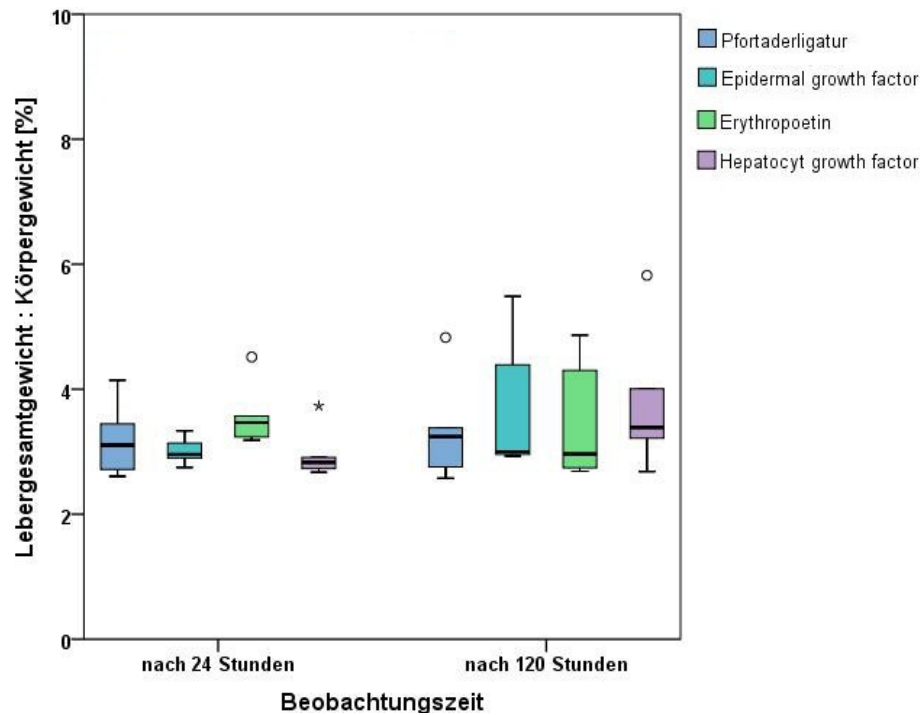
Abb. 22: Vergleich des Quotienten aus dem nicht-ligierten Lebergewicht und dem Lebergesamtgewicht zwischen der Pfortaderligatur, HGF, EGF und EPO nach 24 und 120 Stunden



Auch der Anteil der ligierten Leber am Lebergesamtgewicht in Prozent zeigte beim Vergleich der vier Gruppen sowohl nach 24 Stunden ($p=0,113$) als auch nach 120 Stunden ($p=0,45$) keinen Unterschied. Nach 120 Stunden war das Gewicht niedriger als nach 24 Stunden ($p<0,001$).

Der Quotient aus dem Lebergewicht zum Körpergewicht (Abb. 23) war innerhalb der Gruppen nach 24 Stunden ($p=0,058$) und nach 120 Stunden ($p=0,79$) nicht verschieden.

Abb. 23: Vergleich des Quotienten aus dem Lebergesamtgewicht und dem Körpergewicht zwischen der Pfortaderligatur, HGF, EGF und EPO nach 24 und 120 Stunden

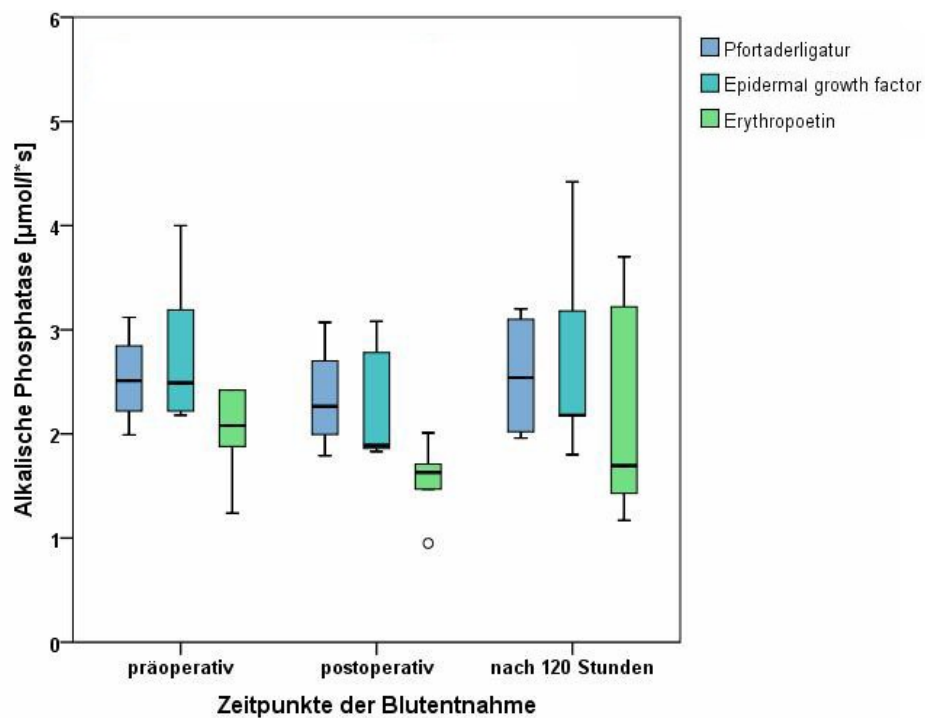


7.3.2 Laborwerte

Die Laborwerte wurden auch hier in allen drei Blutproben präoperativ, postoperativ und nach 120 Stunden gemessen. Gesamteiweiß, Kreatinin und Harnstoff waren weder zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p > 0,3$) noch zwischen den Gruppen ($p > 0,3$) unterschiedlich (Tab. 3-5 im Anhang).

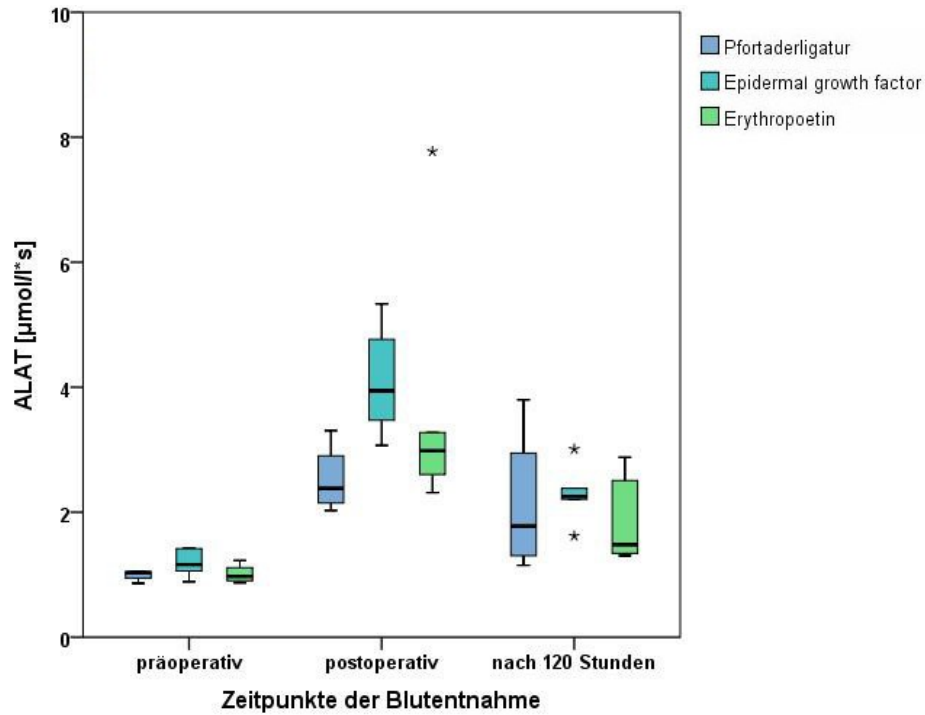
Die alkalische Phosphatase war im Verlauf ($p = 0,1$) nicht unterschiedlich. Zwischen den Gruppen war eine geringe Schwankung messbar ($p = 0,009$) (Abb. 24).

Abb. 24: Vergleich der alkalischen Phosphatase zwischen der Pfortaderligatur, EGF und EPO zu verschiedenen Zeitpunkten



Die ALAT-Werte (Abb. 25) stiegen postoperativ in allen Gruppen an und sanken innerhalb von 120 Stunden ($p < 0,001$). Zwischen den Gruppen waren die Werte vergleichbar ($p = 0,3$).

Abb. 25: Vergleich der ALAT-Werte zwischen der Pfortaderligatur, EGF und EPO zu verschiedenen Zeitpunkten



Das direkte (Tab. 2 im Anhang) und gesamte Bilirubin (Abb. 26) stiegen im Verlauf an ($p < 0,001$). Zwischen den Gruppen unterschieden sich die Werte nicht ($p > 0,08$).

Die GLDH war zwischen den Gruppen nicht verschieden ($p = 0,65$). Allerdings stieg die GLDH im Verlauf in allen Gruppen an ($p < 0,001$) (Abb. 27).

Abb. 26: Vergleich des gesamten Bilirubins zwischen der Pfortaderligatur, EGF und EPO zu verschiedenen Zeitpunkten

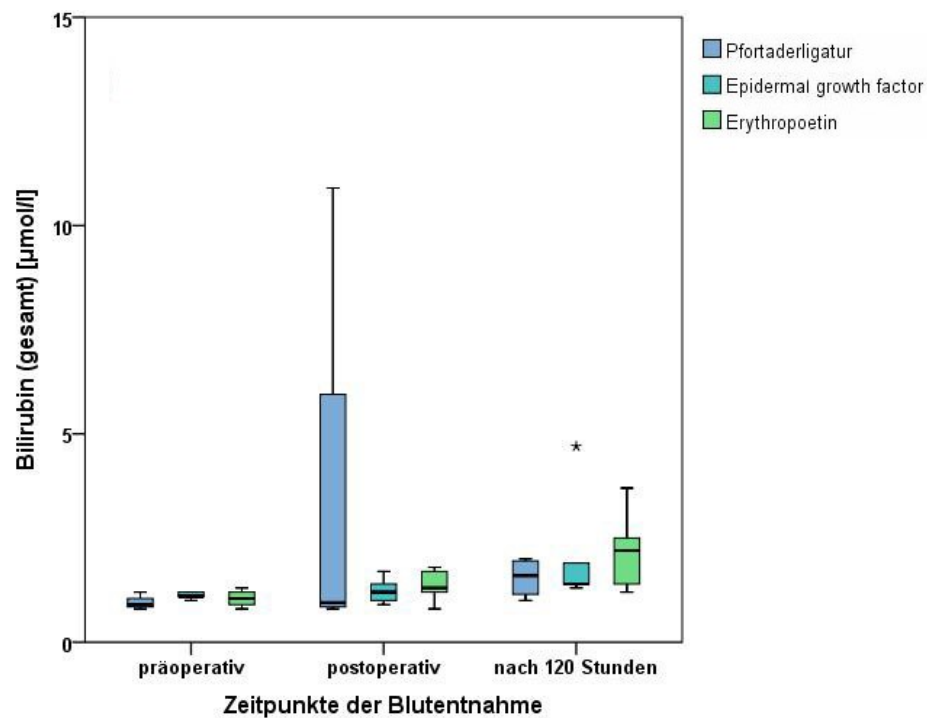
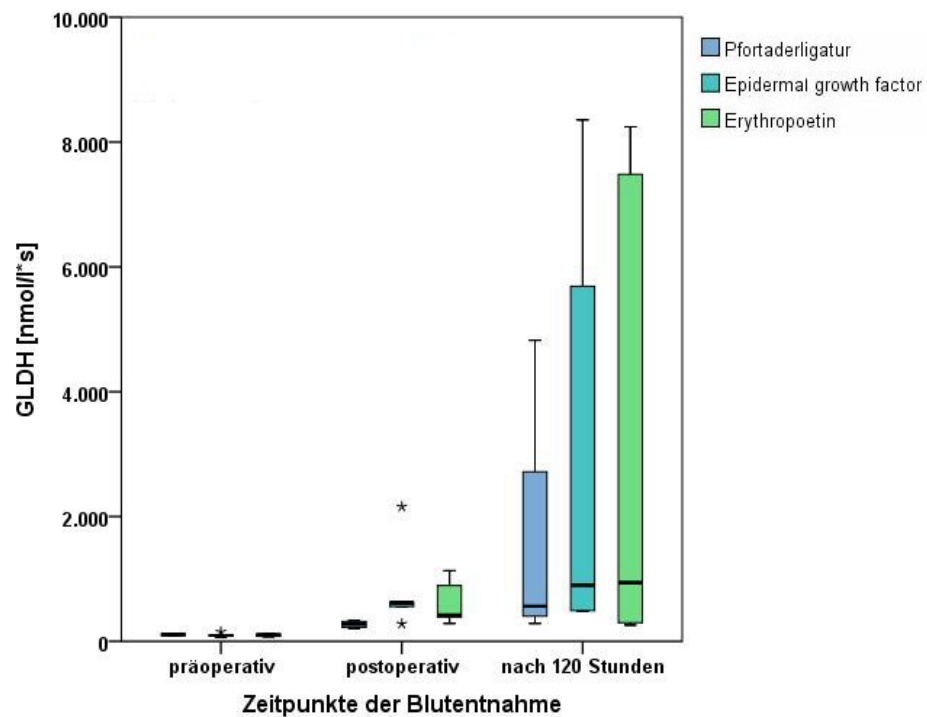


Abb. 27: Vergleich der GLDH-Werte zwischen der Pfortaderligatur, EGF und EPO zu verschiedenen Zeitpunkten



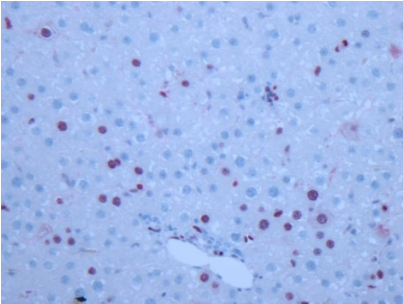
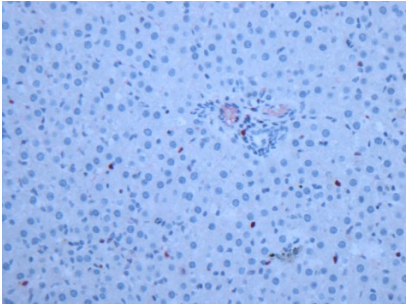
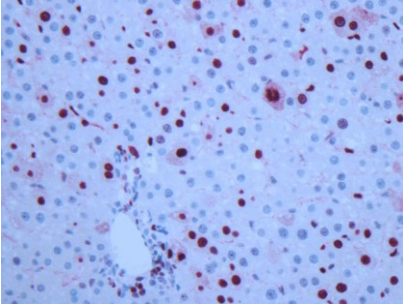
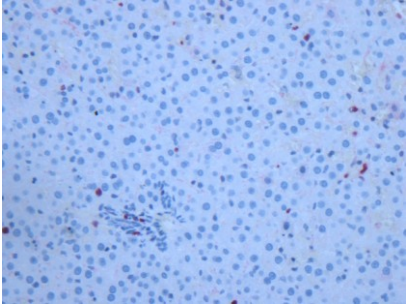
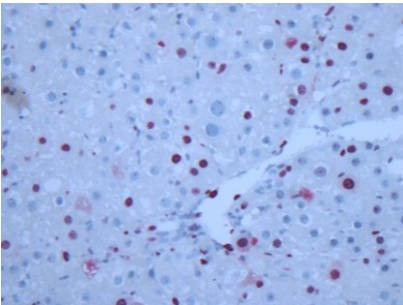
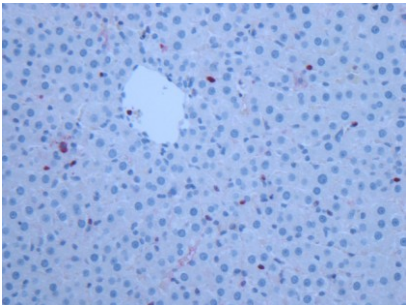
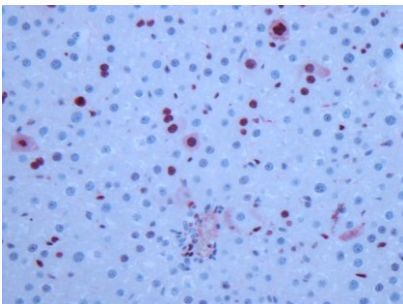
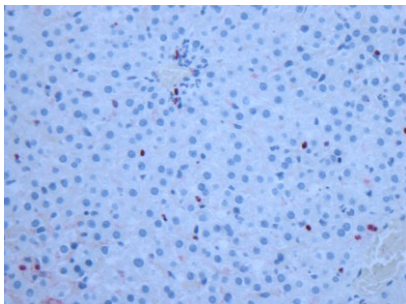
7.3.3 Histologie

Insgesamt unterschied sich der ki-67-Index nicht zwischen den Gruppen ($p=0,24$) und auch nicht im Zeitverlauf ($p=0,14$) (Abb. 28). Im nicht-ligierten Anteil unterschied sich der ki-67-Index ($p=0,003$) auch zwischen den Gruppen. Die EGF-Gruppe hatte den niedrigsten Index. Der Index nahm nach 120 Stunden deutlich ab ($p<0,001$). Die ligierten Abschnitte unterschieden sich zwischen den Gruppen ($p=0,04$), aber nicht im Zeitverlauf ($p=0,8$) (Tab. 9).

Tab. 9: ki-67-Indices im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen im Median (Range) bei der Pfortaderligatur, HGF, EGF und EPO nach 24 und 120 Stunden

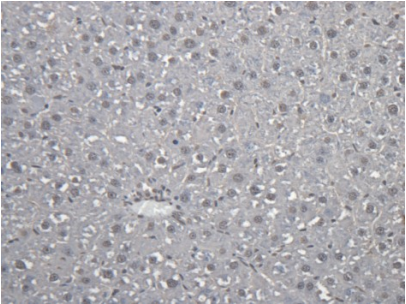
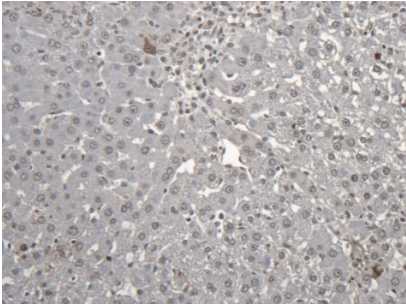

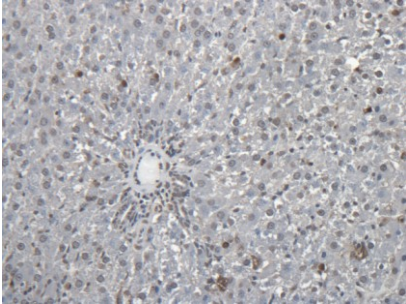
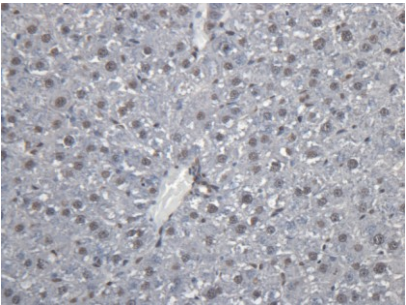
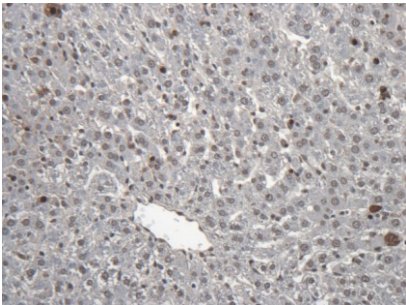
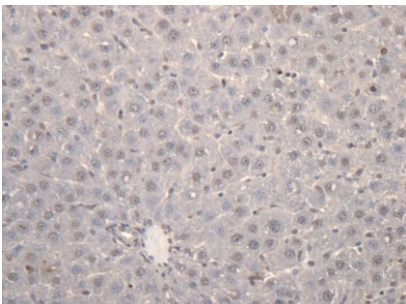
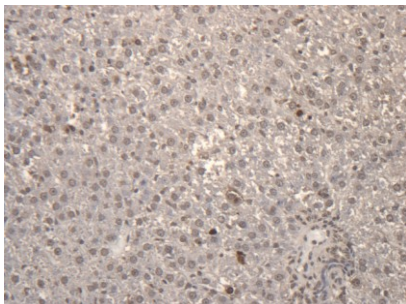
	ki-67 positive Hepatozyten im nicht-ligierten Leberlappen [%]	ki-67 positive Hepatozyten im ligierten Leberlappen [%]
24 STUNDEN		
PVL	13,2 (0,9-63,6)	0,9 (0,0-5,4)
HGF	12,4 (1,2-63,9)	1,0 (0,0-3,2)
EGF	6,1 (0,0-3,9)	1,3 (0,0-8,6)
EPO	13,5 (0,6-27,9)	0,0 (0,0-4,4)
120 STUNDEN		
PVL	9,8 (0,0-25,5)	1,06 (0,0-10,6)
HGF	7,9 (1,59-38,8)	0,69 (0,0-5,2)
EGF	12,7 (0,0-34,6)	0,0 (0,0-2,3)
EPO	5,6 (1,3-37,7)	0,9 (0,0-6,2)

Abb. 28: Beispielhafte Fotos der ki-67-Färbungen vom nicht-ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von PVL mit und ohne Wachstumsfaktoren. Bei der ki-67-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Blautönen, wobei Zellkerne in Proliferation violettrot erscheinen.

	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
PVL		
EGF		
HGF		
EPO		

Die Apoptose unterschied sich nur marginal zwischen den Gruppen ($p=0,07$) (Abb. 29). In den ligierten Abschnitten war sie in der PVL-Gruppe niedriger ($p=0,002$). In den nicht-ligierten Abschnitten war die Apoptose nicht verschieden ($p=0,99$) (Tab. 10).

Abb. 29: Beispielhafte Fotos der TUNEL-Färbungen vom ligierten Leberabschnitt nach 120 Stunden von PVL mit und ohne Wachstumsfaktoren. Bei der TUNEL-Färbung zeigen sich die inaktiven Hepatozytenkerne in Grautönen, wobei Zellkerne in Apoptose dunkelbraun erscheinen.

	Nicht-ligierte Leberabschnitte	Ligierte Leberabschnitte
PVL		
EGF		
HGF		
EPO		

Tab. 10: TUNEL-Indices im ligierten und nicht-ligierten Leberlappen im Median (Range) bei der Pfortaderligatur, HGF, EGF und EPO nach 120 Stunden

	TUNEL positive Hepatozyten im nicht-ligierten Leberlappen [%]	TUNEL positive Hepatozyten im ligierten Leberlappen [%]
120 STUNDEN		
PVL	0,0 (0,0-2,4)	1,0 (0,0-5,2)
HGF	0,0 (0,0-3,5)	1,7 (0,0-5,5)
EGF	0,0 (0,0-0,5)	1,6 (0,0-9,5)
EPO	0,0 (0,0-0,7)	1,9 (0,0-33,6)

8 Diskussion

8.1 Methodendiskussion

Die Effektivität der Pfortaderembolisation und der Pfortaderligatur wurden in der Literatur miteinander verglichen. Nach Pfortaderembolisation war die FLRV signifikant größer als nach der Ligatur (van den Esschert et al. 2011). Dieser Unterschied wird von den Autoren durch die Embolisation der portalvenösen Peripherie begründet. Dabei soll der portalvenöse Links-Rechts-Shunt vermieden werden, der zu verringertem Regenerationsreiz mit konsekutiv geringerer Hypertrophie führt. Furrer et al. beschrieben dagegen eine höhere Zunahme der FLRV nach der Ligatur. Sie führten diesen Unterschied auf das verwendete Material zurück, das eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion hervorruft (Furrer et al. 2008). In der embolisierten Leber stieg die Zahl der Makrophagen an, die wiederum in der nicht-embolisierten Leber zur Auslösung der Leberregeneration benötigt wird.

Aufgrund der gelappten Leberanatomie spielt der Links-Rechts-Shunt bei der Ratte keine wesentliche Rolle. Die Pfortaderligatur bei der Ratte wurde ausgewählt, um den Hypertrophie-Atrophie-Effekt zu induzieren, weil sie ein verlässliches Tiermodell mit geringerem technischen und logistischen Aufwand ist.

Die Wahl der Wachstumsfaktoren erfolgte nach den schon beschriebenen hepatotropen Eigenschaften und wurde bisher noch nicht gemeinsam in einem Pfortaderligaturmodell verglichen. Als Negativkontrolle wurde die zusätzliche Induktion einer akuten Cholestase gewählt. Sie soll den Effekt einer Pfortaderligatur bei geschädigter Leber zeigen.

8.2 Pfortaderligatur und Kontrolle

Rous und Larimore beschrieben nach Untersuchungen beim Kaninchen, dass der ligierte Leberlappen atrophiert und der nicht-ligierte an Größe zunimmt (Rous und Larimore 1920). Ozawa et al. belegten dann erstmals den Einfluss

der Pfortaderligatur auf den mitochondrialen Stoffwechsel der Leber bei Ratten (Ozawa et al. 1971). Nachdem im Tierexperiment von Kraus und Beltran (Kraus und Beltran 1959) eine Tumorregression nach Ligatur der Pfortaderastes nachweisbar war, der den Tumor versorgte, wurde die Pfortaderligatur erstmals von Honjo et al. an 20 Patienten mit Lebermalignomen klinisch eingesetzt (Honjo et al. 1975). Die Überlebenszeit betrug bei einem Patienten sogar sechs Jahre. Kinoshita et al. kombinierten die transarterielle Embolisation des Tumors mit einer Pfortaderembolisation bei 21 Patienten (50-72 Jahre), die an einem kleinen hepatozellulärem Karzinom litten (Kinoshita et al. 1986). Beim Vergleich der Auswertungen von prä- und postinterventionellen Lebervolumina bestätigte sich eine Volumenzunahme der unbehandelten Leber. Makuuchi et al. entdeckten, dass bei einer vorher bestehenden Thrombose der Pfortader und nachfolgenden Leberresektion der betroffenen Seite, der nicht betroffene Leberanteil eine bessere Funktion aufwies (Makuuchi et al. 1990). Daraus entwickelte sich die Idee, die Pfortader vor einer geplanten Leberresektion gezielt auf der betroffenen Seite zu unterbinden oder zu embolisieren. Die kompensatorische Hypertrophie der Restleber wurde damit eine anerkannte Methode, die seitdem im klinischen Alltag sehr erfolgreich eingesetzt wird.

8.2.1 Gewicht

In unserer Studie atrophierten die ligierten Leberlappen nach der 70%igen Pfortaderligatur und kompensatorisch hypertrophierten die nicht-ligierten Abschnitte. Unsere Ergebnisse sind sehr gut vereinbar mit denen anderer Arbeitsgruppen. Sugimoto et al. untersuchten zum Beispiel männliche Sprague-Dawley-Ratten, unterzogen sie einer 70%igen Pfortaderligatur mit Ligatur der lateralen und medianen Leberlappen und beobachteten die Tiere sieben und vierzehn Tage (n=36) (Sugimoto et al. 2009). Das relative nicht-ligierte Lebergewicht stieg von $9,3 \pm 0,97$ Prozent vor Pfortaderligatur auf $23,7 \pm 1,7$ Prozent nach sieben Tagen und auf $26,7 \pm 2,7$ Prozent nach 14 Tagen. Tanaka et al. verglichen bei Wistar-Ratten (200-230 g) die Pfortaderembolisation, die Pfortaderembolisation

mit nachfolgender 70%iger Hepatektomie und alleiniger 70%iger Hepatektomie (Tanaka et al. 1994). Der nicht-ligierte Anteil war bei der alleinigen Pfortaderembolisation nach sieben Tagen doppelt so groß wie in der Kontrollgruppe und bestand aus Dreiviertel der Gesamtlebermasse. Steiner und Martinez ligierten die Pfortader der linken und medianen Lappen (Steiner und Martinez 1961). Das nicht-ligierte Lebergewicht wuchs ab dem zweiten Tag stark bis zum vierten Tag, danach nahm die Wachstumsgeschwindigkeit ab. Der ligierte Anteil verlor dagegen 85 Prozent des Lebergewichtes im Vergleich zur Kontrolle. Nach dem siebten Tag veränderte sich das Gewicht nur noch sehr wenig. Bei Lee et al. begann der nicht-ligierte Anteil bereits am ersten Tag nach PVL zu wachsen und stieg auf das Dreifache bis zum siebten Tag (Lee et al. 1993). Zwischen dem siebten und 14. Tag fand sich ein Plateau ohne weiteres erkennbares Wachstum. Kollmar et al. beschrieben in seinem Modell, dass das nicht-ligierte Lebergewicht am siebten Tag am höchsten war (Kollmar et al. 2007). Zusammenfassend vermag eine Unterbindung des portalvenösen Blutflusses durch portalvenöse Ligatur die Leberregeneration des nicht-betroffenen Leberteils anzuregen (Goto et al. 1998).

Zwischen der Kontrolle und der PVL zeigte sich bei allen Studien eine signifikante Gewichtszunahme des nicht-ligierten Leberabschnittes. In der Klinik wird der sogenannten future liver remnant volume (FLRV) berechnet. Es ist das Volumen des vermeintlich übrig bleibenden Lebergewebes nach der Resektion. Das FLRV wird relativ zu dem abgeschätzten Lebergesamtgewicht (total estimated liver volume = TELV) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FLRV/TELV} = \text{FLRV}/(\text{Gesamtlebergewebe} - \text{Tumorgewebe})$$

Bei zu geringem relativen FLRV kann die Pfortaderligatur bzw. Embolisation die Situation verbessern, weil bereits zwei bis acht Wochen später das relative Volumen um 20-46 Prozent zugenommen hat. Durch die Vorbehandlung können dann 70-100 Prozent der Patienten einer großen Leberresektion zugeführt werden (Kaneko et al. 2002).

8.2.2 Laborwerte

Nach der Pfortaderligatur stiegen die Leberwerte (ALAT) als Zeichen für den verursachten Leberschaden postoperativ und bleiben auch nach fünf Tagen noch leicht erhöht (ALAT, GLDH). Die Cholestaseparameter (Bilirubin und alkalische Phosphatase) blieben weitgehend normal. Gesamteiweiß, Harnstoff und Kreatinin veränderten sich nicht. Die Funktion der Niere wurde nicht beeinträchtigt.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen (Di Stefano et al. 2005, Hayashi et al. 2010, Matela et al. 2005). Die Transaminasen stiegen nach PVL innerhalb der ersten drei Tage bis zu ihrem Maximum und sanken zwischen dem siebten bis zehnten Tag wieder auf den präoperativen Wert. Die synthetische Funktion der Leber verändert sich dagegen nicht nach der PVL, obgleich das gesamte Bilirubin gering anstieg (Mizuno et al. 1996).

8.2.3 Histologie

In unserer Studie zeigte sich eine erhebliche Proliferation der Hepatozyten im nicht-ligierten Leberanteil nach der Pfortaderligatur. Der ki-67-Index war deutlich erhöht. Im ligierten Leberanteil fanden wir dagegen eine geringe Apoptose und Atrophie nach der PVL. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten De Graaf et al., die bei 20 weiblichen New Zealand-Hasen 80 Prozent der Leber embolisierten (de Graaf et al. 2010). Auch sie beschrieben eine massive Proliferation der Hepatozyten (ki-67) im nicht-ligierten Anteil. Furrer et al. teilten 80 männliche Wistar-Ratten, in vier Gruppen ein, die sie jeweils zu vier verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 Std und 7 Tage) untersuchten (Furrer et al. 2008). Sie führten bei den Tieren entweder eine 70%ige Hepatektomie, eine 70%ige Pfortaderligatur, eine 70%ige Pfortaderembolisation oder eine Sham-Operation durch. Die Hepatektomie ließ die Leber am schnellsten regenerieren und zeigte auch

die höchste Anzahl an ki-67-positiven Zellen, wobei der Effekt der Pfortaderligatur kaum zurückstand. Nach der Pfortaderembolisation regeneriert sich die Leber zeitlich langsamer und es ließen sich auch weniger proliferierende Zellen finden.

Beim apoptotischen Zelltod können drei verschiedene Aktivierungskaskaden unterschieden werden: 1.) die rezeptorvermittelte Aktivierung über Caspase 3, 2.) die mitochondrienvermittelte Aktivierung über die Ausschüttung von Cytochrom C bei Dysfunktionen und 3.) die endoplasmavermittelte Aktivierung über die Stress getriggerte Caspase 12. Die gemeinsame Endstrecke über die Aktivierung von Caspase 9 führt dann zum Zelltod. Bei der Pfortaderligatur wird nach der Arbeitsgruppe von Picard et al. die mitochondriale Kaskade aktiviert (Picard et al. 2004). Die Gründe für den Zelltod sind eine Hypoxie sowie ein Mangel an portalen Leberwachstumsfaktoren. Die Atrophie ist durch die zentrolobuläre Nekrose und durch den apoptotischen Zelltod bedingt (Mueller et al. 2003). Lambotte et al. teilten männliche Wistar-Ratten (200-260 g) in vier Gruppen ein: 1.) Pfortaderligatur des rechten Hauptstammes, 2.) eine Resektion von Zweidritteln der Leber, 3.) eine Resektion von einem Drittel der Leber und 4.) eine Kontrollgruppe mit Sham-Operation (Lambotte et al. 2000). Nach 24 Stunden wurden nach der Pfortaderligatur nur 5 Prozent Nekrosen und nur wenige apoptotische Zellen beschrieben. Nach 48 Stunden stiegen die Nekrosen auf bis zu 20 Prozent des Lebergewebes an und die Zahl der Apoptosen nahm zu.

8.3 Pfortaderligatur mit und ohne Cholestase

8.3.1 Gewicht

In unserer Studie unterschieden sich die Gewichte nicht zwischen der einfachen Pfortaderligatur und der Pfortaderligatur mit gleichzeitiger Unterbindung des Hauptgallengangs, die zur Cholestase führte. In beiden Gruppen hypertrophierte der nicht-ligierte Anteil und atrophierte der ligierte Anteil, wobei beide Effekte

nach 120 Stunden ausgeprägter waren als nach 24 Stunden. Es fiel zusätzlich auf, dass das relative Lebergewicht in Bezug auf das Körpergewicht bei der Pfortaderligatur mit Cholestase etwas anstieg. Dies könnte sich durch den Entzündungsprozess in der cholestatischen Leber sowie dem Rückstau der Gallenflüssigkeit erklären.

Zu ähnlichen Ergebnisse gelangten auch andere Autoren. Mizuno et al. untersuchten männliche Donryu-Ratten (Mizuno et al. 1996). Im ersten Experiment wurde eine 70%ige Pfortaderligatur mit einer Shamoperation verglichen. Im zweiten Experiment wurde eine Hauptgallengangsligatur nach dem Modell von Weinbren (Weinbren 1953) sowie mit Modifikationen von Terasaki et al. (Terasaki et al. 1991) vorgenommen und nach fünf Tagen entweder mit einer Pfortaderligatur oder Sham-Operation kombiniert. Das nicht-ligierte Lebergewicht betrug ungefähr 30 Prozent nach der Pfortaderligatur mit und ohne cholestatischer Schädigung. Die Pfortaderligatur mit Gallengangsligatur hemmte zum fünften Tag das Wachstum auf 65 Prozent im Vergleich zu 75 Prozent nach alleiniger Pfortaderligatur.

Schweizer et al. untersuchten 80 männliche Wistar-Ratten und teilten sie in vier verschiedenen Gruppen ein: 1.) 70%ige Choledochusligatur, 2.) 70%ige Pfortaderligatur; 3.) 70%ige Pfortader- und Choledochusligatur; 4.) Sham-Operation (Schweizer et al. 1995). Das Gesamtlebergewicht korrelierte auch in dieser Studie mit dem Körpergewicht. Die Gewichte von nicht-ligierten und ligierten Anteilen unterschieden sich nicht zwischen der Sham-Operation und der 70%igen Cholestase. Die Pfortaderligatur mit Cholestase zeigte hier einen wachstumsfördernden Effekt. Nach vier Tagen stieg der Anteil des nicht-ligierten Lebergewichtes nach der Pfortaderligatur nur auf 64 Prozent und nach der Kombination aus Pfortaderligatur und Hauptgallengangsstenose auf 75 Prozent.

Yamano et al. untersuchten 40 männliche Wistar-Ratten in drei Modellen: 1.) 70%ige Pfortaderligatur, 2) Hauptgallengangsligatur und 3.) 70%ige Pfortaderligatur nach 7 Tagen vorheriger Gallengangsligatur (Yamano et al. 2002). Hier wirkte die Kombination von Cholestase gering wachstumshemmend. Das nicht-ligierte Lebergewicht in Bezug auf das Gesamtlebergewicht stieg am fünften

Tag nach der Pfortaderligatur mit Cholestase bis auf 58 Prozent, jedoch nicht so wie bei alleiniger Pfortaderligatur auf 81 Prozent.

Andere Autoren beschrieben ebenfalls, dass eine Cholestase das Wachstum des nicht-ligierten Leberabschnittes verringert oder sogar vollständig verhindern kann. Nanashima et al. führten bei 25 Patienten Pfortaderembolisationen durch (Nanashima et al. 2006). Der Unterschied zwischen dem ligierten und dem nicht-ligierten Anteil der Leber war nach der Pfortaderembolisation mit bestehender Cholestase geringer. Der nicht-embolisierte Anteil war nicht sehr viel größer geworden.

Yokoyama et al. erklärten diesen Effekt damit, dass zwar die DNA und RNA bei Pfortaderligatur mit Cholestase erhöht waren, jedoch die Mitose-Indices eine Verringerung der Proliferation der Hepatozyten zeigten (Yokoyama et al. 2007). Als Gründe für das geringere Leberwachstum führten sie an, dass zum einen sich durch die Cholestase die hepatische Hämodynamik geändert habe: die Erweiterung der Gallengänge drücke auf die portalen Zuflüsse, so dass die Hepatozyten nicht proliferieren können. Außerdem belegte dieselbe Arbeitsgruppe, dass die leberproliferationsassoziierten Mediatoren wie EGF und IL-6 (Miyoshi et al. 1999) bei der Cholestase verringert sind. Zusätzlich scheint die toxische Galleanreicherung bei der Cholestase einen Fas-abhängigen Apoptosemechanismus zu induzieren.

Auch andere Autoren beschrieben, dass die Cholestase die Produktion von EGF mRNA (Bissig et al. 2000) und IL-6 im Blut (Fujiwara et al. 2001) vermindert. Koyama et al. berichteten außerdem, dass die Cholestase aufgrund verringerter mitochondrialer Funktion die metabolische Funktion der Leberzellen reduziert (Koyama et al. 1981).

8.3.2 Laborwerte

Unsere Auswertung der Laborwerte nach 120 Stunden zeigte beim Bilirubin (gesamt und direkt), alkalischer Phosphatase, ALAT und GLDH einen höheren Anstieg nach der Pfortaderligatur mit Cholestase im Vergleich zur alleinigen

Pfortaderligatur. Bei ALAT fiel der Wert nach 120 Stunden bei der Kombination mit der Cholestase im Gegensatz zur alleinigen Pfortaderligatur jedoch noch nicht wieder auf die präoperativen Werte. Gesamteiweiß, Harnstoff und Kreatinin zeigten in beiden Gruppen keine Veränderungen. Die Funktion der Niere wurde nicht beeinflusst.

Ähnlich Unterschiede beschrieben auch andere Autoren. Das Gesamt-Bilirubin sowie die alkalische Phosphatase waren nach Pfortaderligatur mit Cholestase am höchsten. Die erhöhten Transaminasen waren am siebten postoperativen Tag wieder fallend (Nanashima et al. 2006). Bei Mizuno et al. (siehe 8.2.1) stiegen die ASAT-Werte nach der Pfortaderligatur mit Cholestase nur moderat an, aber der Anstieg war deutlich früher als nach alleiniger Pfortaderligatur und normalisierten sich nach sieben Tagen (Mizuno et al. 1996). Nach der Gallengangsligatur stieg das Bilirubin nach dem fünften Tag erwartungsgemäß auf über 119 $\mu\text{mol/l}$. Bei Yamano et al. (siehe 8.2.1) erhielten sie bei alleiniger Pfortaderligatur Bilirubin-Werte (gesamt) um 3 $\mu\text{mol/l}$ und bei einer kombinierten Pfortaderligatur mit Cholestase von 22,7 $\mu\text{mol/l}$ bis hin zu 119 $\mu\text{mol/l}$. (Yamano et al. 2002). Bei den letzten beiden Arbeitsgruppen wuchs der nicht-ligierte Leberanteil trotz der hohen Werte stark an, während bei anderen Autoren (Imamura et al. 1999) die erhöhten Bilirubinwerte mit einer geringeren Hypertrophie des nicht-ligierten Lappens einhergingen.

Nagino et al. sahen die alkalische Phosphatase neben dem Hinweis auf eine Cholestase auch als einen Marker für Leberregeneration an (Nagino et al. 1999).

Georgiev et al. zeigten den zeitlichen Verlauf vom Leberschaden bishin zur Leberregeneration nach einer Hauptgallengangsligatur bei Mäusen. Der akute Leberschaden zeigte sich durch schnell ansteigende Transaminasen bis zum zweiten Tag nach der Gallengangsligatur. Am fünften Tag wirkte die Leberregeneration gemessen an der höchsten Anzahl an ki-67-positiven Zellen dem Leberschaden erfolgreich (sinkende ALAT-Werte) entgegen (Georgiev et al. 2008).

In unserer Studie hatten die hohen Leberwerte keinen wesentlichen negativen Einfluss auf das Wachstum. Man könnte meinen, dass die Pfortaderliagtur bei

einer geschädigten Leber ebenso vielversprechend wäre und der Leberschaden durch die Cholestase den Wachstumserfolg nicht vermindert.

8.3.3 Histologie

Die Proliferation der Hepatozyten, angezeigt durch den ki-67-Index, war nach 24 Stunden bei alleiniger Pfortaderligatur höher als bei zusätzlicher Gallengangsligatur. Nach 120 Stunden kehrten sich die Verhältnisse aber um: Nach einem deutlichen Schub der Proliferation war der ki-67-Index signifikant höher bei der Pfortaderligatur mit Gallengangsligatur. Die Cholestase förderte bei uns die Proliferation nach 120 Stunden.

Auch Yamano et al. (siehe 8.2.1) belegten, dass die zusätzliche Cholestase bei der Pfortaderligatur das Proliferationsmaximum herabsetzt, wobei allerdings über längere Zeit leicht erhöhte Proliferationswerte im Vergleich zur alleinigen Pfortaderligatur nachweisbar waren (Yamano et al. 2002). In dieser Studie war auffällig, dass die cholestatische Leber deutlich langsamer atrophierte, was von den Autoren auf die Fibroseentwicklung und den Gallerückstau zurückgeführt wurde.

Azmaiparashvili et al. ligierten bei 30 männlichen Wistar-Ratten (200-220 g) den Hauptgallengang (Azmaiparashvili et al. 2009). Der Mitose-Index als Zeichen der Hepatozytenproliferation zeigte ein Maximum der Proliferation der Hepatozyten am vierten Tag nach der Gallengangsligatur. Steiner und Martinez ligierten ebenfalls den Hauptgallengang und beschrieben danach ein ausgeprägtes Ödem um die großen Gallengänge, was mit einer geringen inflammatorischen Reaktion einherging (Steiner und Martinez 1961). Außerdem waren auch hier ein Ikterus, eine Leberatrophie, ausgedehnte Nekrosebereiche, eine diffuse Fibrose und Ganghyperplasien nachweisbar.

Andere Autoren (Kullak-Ublick und Meier 2000) beschrieben bei einer Cholestase eine Zunahme der Apoptose und der Nekrose.

Bei uns wurden bei alleiniger Pfortaderligatur mehr apoptotische Zellen nachgewiesen als nach zusätzlicher Gallengangsligatur. Die Cholestase zeigte überraschender Weise eher eine Abnahme der Apoptose. Der Regenerationsreiz überwiegt zunächst und rückt die Apoptose in den Hintergrund.

8.4 Pfortaderligatur mit und ohne Wachstumsfaktoren

Das nicht-ligierte Lebergewicht nahm nach 120 Stunden deutlich zu, aber es unterschied sich nicht von den Gruppen, die zusätzlich Wachstumsfaktoren erhielten. Das gesamte Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht unterschied sich nicht im gesamten Zeitverlauf und war zwischen den Gruppen vergleichbar.

Die alkalische Phosphatase war nicht erhöht und es fanden sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen. ALAT, GLDH, direktes und gesamtes Bilirubin stiegen nach allen Interventionen vergleichbar. Der durch eine Pfortaderligatur verursachte Leberschaden wurde somit durch die Gabe der Wachstumsfaktoren in den nicht-ligierten Leberanteil nicht erkennbar vermindert.

Der nicht-ligierte Leberabschnitt zeigte in allen Gruppen eine deutliche Proliferation, wobei die Applikation von HGF tendenziell nach 24 Stunden ein höheres Leberwachstum zeigte. Die Apoptose der ligierten Leberabschnitte waren in der PVL niedriger als in den Gruppen mit den Wachstumsfaktoren, während sich die Apoptose in den nicht-ligierten Leberanteilen nicht unterschied. Die Apoptose in den ligierten Leberabschnitten wurden durch die Wachstumsfaktoren gehemmt.

8.4.1 Epidermal growth factor

EGF bindet an EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Hepatozyten und induzieren eine Zellproliferation. Bisher wurden keine Studien publiziert, die die portalvenöse Gabe von EGF nach Pfortaderligatur überprüft haben. Es könnten deshalb nur tierexperimentelle Ergebnisse diskutiert werden, die EGF und seine Rezeptoren in der Leber betrachten.

Webber et al. beschrieben in einem in vivo Ratten-Modell, dass die Infusion von bis zu 80 µg TGFα und EGF in die Pfortader nach 24 Stunden kaum einen Effekt auf die DNA-Synthese bei einer gesunden, unbehandelten Leber bewirkte (Webber et al. 1994). HGF führte dagegen bei einer normalen Leber zur dreifachen Steigerung der DNA-Synthese. Nach einer 30%igen Leberresektion führten 40 µg EGF zu einer dreifachen Steigerung, TGFα und HGF sogar zu einer sechsfachen Steigerung der DNA-Synthese im Vergleich zu einer Leberresektion ohne zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren. Bei einer 30%igen Resektion hatte EGF somit einen stimulierenden Effekt auf die DNA-Synthese.

Baier et al. verglichen bei 70 Sprague-Dawley Ratten (350-500 g) eine 80%ige Hepatektomie mit einer Ischämie und Reperfusion (Baier et al. 2006). Nach jeweils 0.5, 2, 6, 12, 24 und 72 Stunden wurde die Expression von EGF-, FGF- (Fibroblast growth factor), HGF- und TNF1-Rezeptoren bestimmt. Sowohl nach 80%iger Hepatektomie als auch nach der Ischämie und Reperfusion war die Expression von allen Rezeptoren nach 6, 12 und 72 Stunden erhöht. Nach 24 Stunden wurde aber eine ausgeprägte Verminderung der Rezeptoren festgestellt. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die therapeutische Gabe von Wachstumsfaktoren 24 Stunden nach einem Leberschaden aufgrund der niedrigeren Rezeptorenzahl nicht erfolgversprechend sein könnte. Auch bei unserer Arbeit war das Leberwachstum von der HGF- und von der EGF-Gruppe nach 24 Stunden etwas geringer ausgefallen als nach der Gabe von EPO. Nach 120 Stunden lag das nicht-ligierte Leberwachstum von der EPO-Gruppe wieder zurück.

Ishii et al. beschrieben in ihrer Studie an Wistar-Ratten den Einfluss von EGF (25 µg/kg/d) nach 70%iger Hepatektomie (Ishii et al. 1995). Nach vier Tagen

zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem relativen Lebergewicht der Kontrollgruppe ($4,20 \pm 0,07$ Prozent) und der EGF-Gruppe ($4,13 \pm 0,13$ Prozent). Auch die Regenerationsrate unterschied sich bei der Kontrolle von $92,0 \pm 3,1$ Prozent und bei EGF von $97,1 \pm 4,4$ Prozent nur gering.

Auch in unserer Studie war der wachstumsfördernde Reiz von intraportal applizierten EGF nur marginal ausgeprägt, so dass man von der portalvenösen EGF-Applikation neben der Pfortaderligatur keine große klinische Relevanz erwarten kann.

8.4.2 Erythropoetin

Bockhorn et al. untersuchten den Effekt von EPO nach 70%iger und 90%iger Leberresektion sowie 30%iger Lebertransplantation bei männlichen Lewis Ratten (250-300 g) (Bockhorn et al. 2008). EPO oder hitze-inaktiviertes EPO als Placebo wurden präoperativ intraperitoneal und intraoperativ intravenös appliziert. Vor Versuchsbeginn wurde die optimale Dosierung des EPO mit 3×1 IU/g Körpergewicht an drei verschiedenen Tagen ermittelt. Bei beiden partiellen Hepatektomien entsprach die zunehmende Zellmasse der steigenden Proliferation (ki-67-Indexzahl). Sowohl nach der 70%igen als auch der 90%igen Hepatektomie wurde eine deutliche Zunahme der Proliferation festgestellt. Nach der Lebertransplantation mit EPO stieg die Lebermasse nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe an, die Apoptose (TUNEL) verminderte sich, aber die Proliferation unterschied sich nicht.

Greif et al. überprüften an 90 männlichen Wistar-Ratten (250-300 g), ob präoperativ appliziertes rhEPO nach Leberresektion einen positiven Einfluss auf die Leberregeneration ausübt (Greif et al. 2010). Alle Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: Sham-Operation oder 70%ige Leberresektion mit rhEPO oder Kochsalzlösung. In der rhEPO-Gruppe war ein vermehrtes Lebergewicht und erhöhte kurzfristige Proliferation nachweisbar. Die Apoptose unterschied sich nicht.

Schmeding et al. untersuchten männliche Wistar-Ratten (230-270 g), um den stimulierenden Effekt von rhEPO nach 70%iger und 90%iger Hepatektomie zu

überprüfen (Schmeding et al. 2008). Dazu wurde das rhEPO entweder einmalig intraportal während der Operation (4000 IU/kg rhEPO) oder postoperativ subkutan über drei Tage (12000 IU/kg rhEPO) appliziert oder nur Kochsalzlösung in die Portalvene injiziert (Kontrolle). EPO hatte einen wachstumsfördernden Effekt, der bei der intraportalen Gabe höher war als bei der subkutanen Gabe. Die Proliferationen waren deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

Le Minh et al. fanden an männlichen Mäusen heraus, dass die Gabe von Darbepetin- α in den retrobulbären Venenplexus bei induziertem, akutem Leberversagen die intrahepatische Entzündungsreaktion, der Leberschaden sowie die Apoptoserate vermindert werden konnte (Le Minh et al. 2007).

Andere tierexperimentelle Studien, die die intraportale Gabe von Erythropoetin nach einer Pfortaderligatur untersuchten, wurden bisher nicht veröffentlicht. In unserer Studie war der Einfluss von EPO nicht so deutlich, so dass der potentielle Nutzen von EPO weiterhin klärungsbedürftig ist.

8.4.3 Hepatocyte growth factor

Ishii et al. untersuchten an Wistar-Ratten den Einfluss von rhHGF auf die Leberregeneration nach 70%iger Hepatektomie (Ishii et al. 1995). Sie applizierten entweder Kochsalzlösung, rhHGF (100 μ g/kg/d) oder rhHGF (100 μ g/kg/d) mit Heparin (500 μ g/kg/d) über eine intravenös implantierte Pumpe. Nach der Leberresektion konnte das Leberwachstum und die Regenerationsrate durch rhHGF im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigert werden. Eine weitere Stimulation des Wachstums war durch zusätzliche, gleichzeitige Gabe von Heparin möglich. Die Autoren vermuteten, dass die zusätzliche Gabe von Heparin zur verminderten Metabolisierung des HGFs führt und somit für das erhöhte Wachstum verantwortlich sein könnte.

Nishino et al. beschrieben in ihrer Studie an 108 Sprague-Dawley-Ratten die Effekte der präoperativen Gabe von humanem HGF Genplasmid nach 70%iger Hepatektomie bei bestehender Zirrhose (Nishino et al. 2008). Sie führten bei allen Tieren eine 2/3 Leberresektion durch und untersuchten drei Gruppen: 1.)

mit einer gesunden Leber, 2.) mit einer zirrhotischen Leber und HGF und 3.) mit einer zirrhotischen Leber und Placebo-Injektion. Die Zirrhose wurde durch die Vorbehandlung mit Dimethylnitrosamine (DNM) über vier Wochen induziert. In ihrem Modell applizierten sie 72 Stunden vor der 70%igen Hepatektomie HGF-HVJ-Liposome (HVJ = hemagglutinating virus of Japan). Der BrdU-Index als immunhistochemischer Proliferationsindex zeigte bis 12 Stunden nach der Operation keine Proliferation. Die Überlebensrate der Ratten in der zirrhotischen Gruppe wurde durch HGF im Vergleich zur Placebo-Gruppe deutlich gesteigert. Die Leberregenerationsrate wurde zwar durch HGF nicht gesteigert, aber die Apoptose wurde von ca. 5 Prozent TUNEL-positiven Hepatozyten auf 1 Prozent durch die Gabe von HGF reduziert.

Die Verwendung von Liposomen in dieser Studie ist ein interessanter Ansatz, da durch die Liposomen die Gefahr der verfrühten Ausscheidung verringert wird und die Chance vergrößert wird, dass HGF und auch rhHGF bei seiner kurzen Halbwertszeit von 3-5 Minuten (Kawaida et al. 1994, Liu et al. 1992) zu seinem Bestimmungsort gelangen kann.

Kaido et al. überprüften an 40 F344-Ratten, ob die Gabe von HGF in der resezierten zirrhotischen Leber das Überleben verbessert. Nach Induktion einer Leberzirrhose ligierten die Untersucher 70% der Pfortader und infundierten entweder rhHGF oder Kochsalzlösung in die Milz. Vier Tage später wurde in beiden Gruppen eine 70%ige Hepatektomie vorgenommen (Kaido et al. 1998). Die Überlebensrate nach 48 Stunden betrug ohne rhHGF 20 Prozent und mit rhHGF 75 Prozent. Am vierten Tag betrug die Lebergröße in der rhHGF-Gruppe $49 \pm 4,4$ Prozent und in der Kontrollgruppe $38,9 \pm 3,6$ Prozent. Die rhHGF-Gabe über eine osmotische Pumpe regt das Leberwachstum an und steigert nach 48 Stunden die Überlebensrate bei einer zirrhotischen Leber nach einer partiellen Hepatektomie.

Ueno et al. untersuchten an 23 Hunden den Einfluss des HGF auf die Leberregeneration nach Pfortaderastligatur des linken Astes bei zirrhotischen Lebern (Ueno et al. 1996). In ihrem Modell applizierten sie im Intervall 0, 5, 12, 24 und 48 Stunden entweder rhHGF (255 ng/kg) oder Kochsalz (Kontrolle) per Bolus über einen Katheter in die Pfortader. 14 Tage nach der Pfortaderastligatur wur-

den die Tiere getötet. In der HGF-Gruppe nahm das Lebergewicht sowohl in den ligierten als auch in den nicht-ligierten Abschnitten deutlich zu. In den nicht-ligierten Abschnitten vergrößerten sich die Hepatozyten und die DNA-Synthese nahm zu. Die Blutwerte ALAT, alkalische Phosphatase, Bilirubin sowie die Clearance-Ratio von Indocyanin grün als Ausdruck der Leberfunktion zeigten zwischen den beiden Gruppen keinen Unterschied.

Yoshikawa et al. überprüften an 30 F344-Ratten, ob rhHGF die Leberregeneration bei cholestatischen Ratten mit nachfolgender 70%iger Hepatektomie verbessert (Yoshikawa et al. 1998). Den Tieren wurde präoperativ und zwölfstündlich postoperativ entweder rhHGF oder Placebo intraperitoneal injiziert. Das Gewicht des nicht-ligierten Anteils (rechte und kaudaler Lappen) war in der rhHGF-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Serumbilirubinkonzentration normalisierte sich nach 24 Stunden in der rhHGF-Gruppe, während er in der Kontrollgruppe weiterhin erhöht blieb. Die BrdU-positive Zellen als Ausdruck der Proliferation waren in der rhHGF-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe angestiegen. Allerdings verminderten sich die Proliferationen nach 48 Stunden in der rhHGF-Gruppe und in der Kontrollgruppe. Auch in unserer Studie stieg die Proliferation nach 24 Stunden unter HGF-Gabe an und verminderte sich nach 120 Stunden.

Kaido et al. untersuchten an 50 F344-Ratten, ob die Gabe von rhHGF bei normaler Leber oder bei induzierter Cholestase die Hypertrophie beeinflusst, wenn eine 70%ige Pfortaderligatur vorgenommen wird (Kaido et al. 1999). Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In der Verschlussikterusgruppe wurde der Gallengang drei Tage vor der Pfortaderligatur unterbunden, um eine Cholestase zu simulieren, und in der anderen Gruppe blieb die Leber unbehandelt. Bei allen Tieren wurde eine 70%ige Pfortaderligatur angelegt und entweder rhHGF oder ein Placebo kontinuierlich über eine osmotische Pumpe intraperitoneal infundiert. Die hepatozelluläre Proliferation war nach rhHGF-Gabe im Vergleich zur Placebo-Gruppe deutlich erhöht. Dieser Effekt war bei den Tieren mit dem Verschlussikterus in der Cholestase-Gruppe nicht so ausgeprägt. Die Proliferation nahm bereits nach zwei Tagen ab.

In allen genannten Studien induzierte HGF einen Anstieg der DNA-Synthese, eine Lebervergrößerung oder eine Steigerung der Überlebensrate. Diese Effekte waren in den unterschiedlichsten Modellen nachweisbar. In unserer Studie war der Effekt von HGF im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Wachstumsfaktoren viel versprechend besonders in Hinblick auf die Proliferationsrate nach 24 Stunden. Möglicherweise könnte eine kontinuierliche oder mehrfache Gabe von HGF erforderlich sein, um den Erfolg noch zu steigern.

9 Schlussfolgerung

Wir konnten in unserer Studie belegen, dass eine Pfortaderligatur mit und ohne Gallengangsookklusion in einem tierexperimentellen Modell an Wistar-Ratten sicher und verlässlich durchführbar sind, weil die konsekutive Hypertrophie des nicht-ligierten Leberanteiles und die Atrophie des ligierten Leberabschnitts überall nachweisbar waren. Im Vergleich der Sham- und der PVL-Gruppe traten die in der Literatur hinreichend belegten Veränderungen auf, so dass wir damit die Validität unseres Modells bestätigen konnten.

Die 70%ige Pfortaderligatur in Kombination mit einer Ligatur des Hauptgallenganges simulierte die klinische Situation einer partiellen Pfortaderligatur in einer cholestatischen Leber. In solchen Situationen besteht die Gefahr, dass die intrahepatische Cholestase das Wachstum des nicht-ligierten Leberanteils hemmen könnte, denn eine Cholestase führt normalerweise zu einer Atrophie des gestauten Leberabschnittes. Die Ergebnisse in der Literatur und in unserer Studie sind nicht eindeutig. Neben einem wachstumsfördernden Einfluss durch die Pfortaderligatur wurde immer wieder der schädliche Einfluss durch die Cholestase beschrieben. Es gibt Hinweise für eine stimulierte Genaktivität der Hepatozyten und eine beschleunigte Regeneration bei bestehender Cholestase. In unserer Studie war nur ein schwacher Wachstumsschub nachweisbar, so dass der klinische Effekt marginal sein dürfte.

Der stimulierende Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Hypertrophie des nicht-ligierten Leberanteiles war deutlich schwächer als erwartet. Nur die Applikation von HGF zeigte eine viel versprechende Tendenz zur Steigerung der Leberhypertrophie im Vergleich zur einfachen Pfortaderligatur. Es ist zudem denkbar, dass der einmalige intraportale Bolus von HGF zu gering war und sich der positive Effekt durch eine andere Applikationsweise noch steigern ließ. Ein neuer Ansatz könnte die Betrachtung des Effektes einer intraportalen HGF-Gabe in eine cholestasegeschädigte Leber sein.

Wir verzichteten in unserer Studie auf eine Leberresektion, so dass der tatsächliche Zuwachs an funktionellem Gewebe unklar bleibt. Der Einfluss der

hepatotropen Wachstumsfaktoren auf Lebermalignome wurde hier ebenfalls nicht beleuchtet.

10 Literaturverzeichnis

Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. 2001. Portal vein embolization: rationale, technique and future prospects. *Br J Surg*, 88(2):165-175.

Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. 2009. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News*, (168):111-116.

Baier P, Wolf-Vorbeck G, Hempel S et al. 2006. Effect of liver regeneration after partial hepatectomy and ischemia-reperfusion on expression of growth factor receptors. *World J Gastroenterol*, 12(24):3835-3840.

Bissig KD, Marti U, Solioz M et al. 2000. Epidermal growth factor is decreased in liver of rats with biliary cirrhosis but does not act as paracrine growth factor immediately after hepatectomy. *J Hepatol*, 33(2):275-281.

Bockhorn M, Fingas CD, Rauen U et al. 2008. Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. *Transplantation*, 86(11):1578-1585.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL et al. 1991. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251(4995):802-804.

de Graaf W, van den Esschert JW, van Lienden KP et al. 2010. A rabbit model for selective portal vein embolization. *J Surg Res*, 171(2):486-494.

Di Stefano DR, de BT, Denys A et al. 2005. Preoperative percutaneous portal vein embolization: evaluation of adverse events in 188 patients. *Radiology*, 234(2):625-630.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1):45-53.

Fisher JW, Koury S, Ducey T et al. 1996. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol*, 95(1):27-32.

Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A et al. 1993. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology*, 18(6):1443-1449.

Fujiwara Y, Shimada M, Yamashita Y et al. 2001. Cytokine characteristics of jaundice in mouse liver. *Cytokine*, 13(3):188-191.

Furrer K, Tian Y, Pfammatter T et al. 2008. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*, 47(5):1615-1623.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3):493-501.

Georgiev P, Jochum W, Heinrich S et al. 2008. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*, 95(5):646-656.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133(4):1710-1715.

Goto Y, Nagino M, Nimura Y. 1998. Doppler estimation of portal blood flow after percutaneous transhepatic portal vein embolization. *Ann Surg*, 228(2):209-213.

Greengard O, Federman M, Knox WE. 1972. Cytofluorimetry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J Cell Biol*, 52(2):261-272.

Hasuike S, Ido A, Uto H et al. 2005. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 20(11):1753-1761.

Hayashi H, Beppu T, Sugita H et al. 2010. Serum HGF and TGF-beta1 levels after right portal vein embolization. *Hepatol Res*, 40(4):311-317.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of liver: restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch.Pathol* 365, 179-183. 1931.

Honjo I, Suzuki T, Ozawa K et al. 1975. Ligation of a branch of the portal vein for carcinoma of the liver. *Am J Surg*, 130(3):296-302.

Imamura H, Shimada R, Kubota M et al. 1999. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology*, 29(4):1099-1105.

Ishii T, Sato M, Sudo K et al. 1995. Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats. *J Biochem*, 117(5):1105-1112.

Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W et al. 1957. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, 179(4560):633-634.

Kaido T, Seto S, Yamaoka S et al. 1998. Perioperative continuous hepatocyte growth factor supply prevents postoperative liver failure in rats with liver cirrhosis. *J Surg Res*, 74(2):173-178.

Kaido T, Yoshikawa A, Seto S et al. 1999. Hepatocyte growth factor supply accelerates compensatory hypertrophy caused by portal branch ligation in normal and jaundiced rats. *J Surg Res*, 85(1):115-119.

Kaneko T, Nakao A, Takagi H. 2002. Clinical studies of new material for portal vein embolization: comparison of embolic effect with different agents. *Hepatogastroenterology*, 49(44):472-477.

Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H et al. 1994. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10):4357-4361.

Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. 1994. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods*, 177(1-2):113-117.

Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K et al. 1986. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 10(5):803-808.

Kollmar O, Corsten M, Scheuer C et al. 2007. Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular remodeling, normoxygenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(6):1534-1542.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ et al. 1991. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, 77(11):2497-2503.

Koyama K, Takagi Y, Ito K et al. 1981. Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice. *Am J Surg*, 142(2):293-299.

Kraus GE, Beltran A. 1959. Effect of induced infarction on rat liver implanted with Walker carcinoma 256. *Arch Surg*, 79:769-774.

Kullak-Ublick GA, Meier PJ. 2000. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis*, 4(2):357-385.

Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E. 1961. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood*, 18:527-534.

Kusashio K, Shimizu H, Kimura F et al. 2009. Effect of excessive acute-phase response on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology*, 56(91-92):824-828.

Lambotte L, Li B, Leclercq I et al. 2000. The compensatory hyperplasia (liver regeneration) following ligation of a portal branch is initiated before the atrophy of the deprived lobes. *J Hepatol*, 32(6):940-945.

Le Minh K, Klemm K, Abshagen K et al. 2007. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol*, 170(6):1954-1963.

Lee KC, Kinoshita H, Hirohashi K et al. 1993. Extension of surgical indications for hepatocellular carcinoma by portal vein embolization. *World J Surg*, 17(1):109-115.

Liu KX, Kato Y, Narukawa M et al. 1992. Importance of the liver in plasma clearance of hepatocyte growth factors in rats. *Am J Physiol*, 263(5):G642-G649.

Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K et al. 1990. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*, 107(5):521-527.

Matela J, Zabavnik Z, Jukic T et al. 2005. Selective portal vein embolization as introduction in major surgery. *Coll Antropol*, 29(1):163-167.

Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T et al. 1995. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Biochem*, 118(3):643-649.

Matsumoto K, Nakamura T. 1992. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit Rev Oncog*, 3(1-2):27-54.

Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H et al. 1992. Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids. *J Biol Chem*, 267(35):24917-24920.

McCormick D, Chong H, Hobbs C et al. 1993. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology*, 22(4):355-360.

Michalopoulos GK. 2007. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 213(2):286-300.

Mitchell C, Nivison M, Jackson LF et al. 2005. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem*, 280(4):2562-2568.

Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ et al. 1999. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*, 117(3):669-677.

Mizuno S, Nimura Y, Suzuki H et al. 1996. Portal vein branch occlusion induces cell proliferation of cholestatic rat liver. *J Surg Res*, 60(1):249-257.

Mueller L, Grotelueschen R, Meyer J et al. 2003. Sustained function in atrophying liver tissue after portal branch ligation in the rat. *J Surg Res*, 114(2):146-155.

Nagino M, Nimura Y, Kamiya J et al. 1999. Serum alkaline phosphatase after extensive liver resection: a study in patients with biliary tract carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 46(26):766-770.

Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP et al. 1991. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene*, 6(4):501-504.

Nanashima A, Sumida Y, Shibasaki S et al. 2006. Parameters associated with changes in liver volume in patients undergoing portal vein embolization. *J Surg Res*, 133(2):95-101.

Natarajan A, Wagner B, Sibilia M. 2007. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43):17081-17086.

Nishino M, Iimuro Y, Ueki T et al. 2008. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes. *Surgery*, 144(3):374-384.

Ozawa K, Takasan H, Kitamura O et al. 1971. Effect of ligation of portal vein on liver mitochondrial metabolism. *J Biochem*, 70(5):755-764.

Picard C, Starkel P, Sempoux C et al. 2004. Molecular mechanisms of apoptosis in the liver of rats after portal branch ligation with and without retrorsine. *Lab Invest*, 84(5):618-628.

Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R et al. 2011. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*, 149(5):713-724.

Rauchfuss F, Lambeck S, Claus RA et al. 2012. Sustained liver regeneration after portal vein embolization --a human molecular pilot study. *Dig Liver Dis*, 44(8):681-688.

Robert Koch-Institut. 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. Achte Ausgabe. Berlin.

Rous P, Larimore LD. 1920. Relation of the portal blood to liver maintenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *J Exp Med*, 31(5):609-632.

Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA. 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta*, 1155(3):357-371.

Schmeding M, Boas-Knoop S, Lippert S et al. 2008. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 23(7 Pt 1):1125-1131.

Schmidt RF, Lang F, Thews G. 2005. *Physiologie des Menschen*. neunundzwanzigste Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Schweizer W, Duda P, Tanner S et al. 1995. Experimental atrophy/hypertrophy complex (AHC) of the liver: portal vein, but not bile duct obstruction, is the main driving force for the development of AHC in the rat. *J Hepatol*, 23(1):71-78.

Steiner PE, Martinez JB. 1961. Effects on the Rat Liver of Bile Duct, Portal Vein and Hepatic Artery Ligations. *Am J Pathol*, 39(3):257-289.

Sugimoto T, Yamada T, Iwata H et al. 2009. Two-stage portal vein ligation facilitates liver regeneration in rats. *Eur Surg Res*, 42(3):181-188.

Suzuki H, Iyomasa S, Nimura Y et al. 1994. Internal biliary drainage, unlike external drainage, does not suppress the regeneration of cholestatic rat liver after partial hepatectomy. *Hepatology*, 20(5):1318-1322.

Tanaka H, Kinoshita H, Hirohashi K et al. 1994. Increased safety by two-stage hepatectomy with preoperative portal vein embolization in rats. *J Surg Res*, 57(6):687-692.

Terasaki M, Kuriki H, Nimura Y et al. 1991. Induction of DNA replication and cell growth in rat liver by obstructive jaundice. *Jpn J Cancer Res*, 82(2):170-175.

Uemura T, Miyazaki M, Hirai R et al. 2000. Different expression of positive and negative regulators of hepatocyte growth in growing and shrinking hepatic lobes after portal vein branch ligation in rats. *Int J Mol Med*, 5(2):173-179.

Ueno S, Aikou T, Tanabe G et al. 1996. Exogenous hepatocyte growth factor markedly stimulates liver regeneration following portal branch ligation in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 38(3):233-237.

van den Esschert JW, van Lienden KP, de GW et al. 2011. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model. *Surgery*, 149(3):378-385.

van Gulik TM, Kloek JJ, Ruys AT et al. 2011. Multidisciplinary management of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumor): extended resection is associated with improved survival. *Eur J Surg Oncol*, 37(1):65-71.

Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. 1994. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*, 19(2):489-497.

Weinbren K. 1953. The effect of bile duct obstruction on regeneration of the rat's liver. *Br J Exp Pathol*, 34(3):280-289.

Yamano T, Hirai R, Hato S et al. 2002. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor-beta1 mRNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery*, 131(2):163-171.

Yasuda H, Imai E, Shiota A et al. 1996. Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology*, 24(3):636-642.

Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007. Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14(2):159-166.

Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg*, 31(2):367-374.

Yoshikawa A, Kaido T, Seto S et al. 1998. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration with prompt improvement of hyperbilirubinemia in hepatectomized cholestatic rats. *J Surg Res*, 78(1):54-59.

Zanjani ED, Poster J, Burlington H et al. 1977. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med*, 89(3):640-644.

11 Anhang

Tab. 2: Laborwerte von direktem Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$] im Median (Range) präoperativ, postoperativ und nach 120 Stunden im Vergleich zwischen Kontrolle, PVL, EGF und EPO

	Präoperativ	Postoperativ	Nach 120 Stunden
Kontrolle	0,5 (0,1-0,8)	0,6 (0,4-1,0)	0,9 (0,7-1,3)
PVL	0,6 (0,3-1,0)	1,0 (0,7-6,6)	1,1 (0,3-1,4)
EGF	0,7 (0,6-0,7)	1,0 (0,8-1,3)	1,2 (1,1-3,6)
EPO	1,0 (0,6-1,1)	1,3 (0,9-1,5)	1,6 (1,1-2,6)

Tab. 3: Laborwerte von Harnstoff [mmol/l] im Median (Range) präoperativ, postoperativ und nach 120 Stunden im Vergleich zwischen Kontrolle, PVL, EGF und EPO

	Präoperativ	Postoperativ	Nach 120 Stunden
Kontrolle	7,4 (6,4-8,8)	7,4(6,6-9,1)	6,1 (5,8-7,4)
PVL	7,7 (6,9-8,9)	8,3 (7,0-9,5)	7,2 (6,7-7,8)
EGF	8,1 (7,3-8,4)	9,2 (8,0-10,0)	7,1 (6,2-8,2)
EPO	8,1 (6,7-9,0)	9,0 (7,6-10,2)	7,0 (5,5-7,8)

Tab. 4: Laborwerte von Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$] im Median (Range) präoperativ, postoperativ und nach 120 Stunden im Vergleich zwischen Kontrolle, PVL, EGF und EPO

	Präoperativ	Postoperativ	Nach 120 Stunden
Kontrolle	50,3 (38,8-56,4)	46,3 (41,3-53,5)	45,8 (34,6-48,0)
PVL	39,2 (35,2-41,7)	44,0 (39,6-46,2)	38,5 (37,4-42,7)
EGF	49,3 (44,3-51,7)	56,6 (52,6-59,6)	40,3 (38,3-48,1)
EPO	44,5 (36,4-52,3)	54,5 (38,6-61,2)	44,1 (39,4-47,5)

Tab. 5: Laborwerte von Gesamteiweiß [g/l] im Median (Range) präoperativ, postoperativ und nach 120 Stunden im Vergleich zwischen Kontrolle, PVL, EGF und EPO

	Präoperativ	Postoperativ	Nach 120 Stunden
Kontrolle	65,9 (60,5-70,5)	60,5 (58,5-62,8)	57,1 (53,5-66,9)
PVL	63,8 (59,9 -65,6)	54,7 (52,8-55,1)	57,2 (56,1-57,6)
EGF	65,3 (61,0-74,0)	52,1 (49,9-61,1)	55,5 (47,9-58,7)
EPO	67,2 (62,6-72,5)	52,8 (45,4-55,5)	58,6 (49,7-62,4)

Lebenslauf

Name:	Annika Marissa Böhm	
Geburtsdatum:	20.06.1988	
Geburtsort:	Düsseldorf	
Eltern:	Vater: Bartholomäus Böhm, Arzt Mutter: Anke Böhm, Hausfrau	
Wohnung:	Hundskapfklänge 26, 72072 Tübingen	
Familienstand:	ledig	
Schulausbildung:	1994-2000	Ludwig-Heck-Grundschule in Berlin
	2000-2002	Eckener-Gymnasium in Berlin
	2002-2006	Evangelisches Ratsgymnasium in Erfurt, Allgemeine Hochschulreife
Studium:	2006-2012	Friedrich-Schiller-Universität in Jena
Beruf:	2013-	Augenklinik der Eberhard-Karls- Universität Tübingen, Assistenzärztin

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich Herr Dr. Falk Rauchfuß bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat, sowie Prof. Dr. Dr. Bartholomäus Böhm bei der statistischen Auswertung bei SPSS,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Tübingen, den 14.05.2013

Unterschrift des Verfassers